

---

# Charakterisierung und neue Anwendungen nichtlinear optischer 3D-Mikroskopie

---

**Characterization and New Applications of Nonlinear Optical 3D Microscopy**

Dissertation von Uwe Petzold

Mai 2013



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

Fachbereich Physik  
Institut für Angewandte Physik  
Nichtlineare Optik und  
Quantenoptik



# Charakterisierung und neue Anwendungen nichtlinear optischer 3D-Mikroskopie

Vom Fachbereich Physik  
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation  
von M.Sc. Uwe Petzold  
aus Worms

Referent: Prof. Dr. Thomas Halfmann  
Korreferent: Prof. Dr. Thomas Walther

Tag der Einreichung: 21.05.2013  
Tag der Prüfung: 10.06.2013

Darmstadt 2013  
D 17





# Inhaltsverzeichnis

<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1 Grundlagen der nichtlinear optischen Mikroskopie</b>	<b>4</b>
1.1 Grundlagen der nichtlinearen Optik . . . . .	6
1.2 Mathematische Beschreibung fokussierter Laserstrahlung . . . . .	8
1.2.1 Winkelspektraldarstellung . . . . .	9
1.2.2 Paraxiale Näherung . . . . .	11
1.3 Frequenzkonversion im Laserfokus . . . . .	15
1.3.1 Erzeugung harmonischer Frequenzen im Boyd-Modell . . . . .	15
1.3.2 Erzeugung harmonischer Frequenzen im Cheng-Modell . . . . .	18
<b>2 Aufbau des nichtlinear optischen Mikroskops</b>	<b>22</b>
2.1 Das Lasersystem . . . . .	22
2.2 Dreidimensionale Fokuspositionierung . . . . .	27
2.3 Separation und Detektion harmonischer Frequenzen . . . . .	30
2.4 Gesamtaufbau im Überblick . . . . .	32
2.5 Charakterisierung des nichtlinear optischen Mikroskops . . . . .	32
2.5.1 Frequenzverdreifung . . . . .	33
2.5.2 Frequenzverdopplung . . . . .	38
<b>3 Untersuchung des emittierten Intensitätsprofils</b>	<b>42</b>
3.1 Dreidimensionale Vermessung der Probe . . . . .	43
3.2 Abhängigkeit der Frequenzkonversion von der Oberflächenneigung . . . . .	45
3.2.1 Intensität und räumliche Auflösung der Frequenzkonversion . . . . .	45
3.2.2 Untersuchung der Abstrahlcharakteristik in der THM . . . . .	50
3.3 Abhängigkeit der Frequenzkonversion von der Grenzflächenorientierung . . . . .	61
3.3.1 Intensität und räumliche Auflösung der Frequenzkonversion . . . . .	61
3.3.2 Einfluss der Orientierung longitudinal verlaufender Grenzflächen auf die Abstrahlcharakteristik der THM . . . . .	66
<b>4 Anwendungen der THM in der Mikrofluidik</b>	<b>71</b>
4.1 Anmerkungen zu relevanten Grundlagen der Mikrofluidik . . . . .	72
4.2 Experimentelle Untersuchung nicht-mischbarer Fluide mittels THM . . . . .	75
4.3 Experimentelle Untersuchung wandnaher Mischungen mittels THM . . . . .	79
<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>86</b>

<b>Abstract</b>	<b>90</b>
<b>A Numerische Simulation der THM</b>	<b>92</b>
A.1 Simulation des abgestrahlten Intensitätsprofils . . . . .	92
A.2 Simulation der emittierten Gesamtleistung . . . . .	96
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>99</b>
<b>Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge</b>	<b>107</b>
<b>Betreute Bachelor- und Masterarbeiten</b>	<b>108</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>109</b>
<b>Danksagung</b>	<b>110</b>

## Einleitung

Seit jeher ist der Mensch danach bestrebt das natürliche Auflösungsvermögen seiner Augen zu übertreffen. Bereits zu Zeiten Galileo Galileis im beginnenden 17. Jahrhundert wurden die ersten Mikroskope entwickelt und eröffneten damit das Forschungsgebiet der Zellbiologie und Histologie [1, 2]. Die meist zweilinsigen *Lichtmikroskope* ermöglichten durch ihre Vergrößerung erstmals die Betrachtung kleiner Objekte. Der hierbei ausgenutzte physikalische Effekt war, neben der Lichtbrechung durch die Linsen, die kontrastbildende Intensitätsmodulation aufgrund der Absorptionsunterschiede innerhalb der zu untersuchenden Objekte.

In den wenigsten, vornehmlich biologischen Proben, genügen die natürlich vorkommenden Absorptionsunterschiede für einen ausreichenden Kontrast. Daher wurden zur Kontrastverbesserung rasch Methoden zum *Anfärben* bestimmter Zell- bzw. Stoffbereiche entwickelt. Eine noch heute bedeutende Rolle spielt hierbei die *Fluoreszenzmikroskopie*. Bei den in dieser Methode zur Markierung der Probe verwendeten Stoffen handelt es sich um Farbstoffe, die im sichtbaren Spektralbereich absorbieren und emittieren. Typischerweise werden die Farbstoffmoleküle durch Licht eines bestimmten Spektralbereichs angeregt und emittieren in einem dazu rot-verschobenen Spektrum. Zudem wurden durch Verwendung einer Lochblende in der Zwischenbildebene des Detektionsstrahlengangs einzelne Probenbereiche – vor allem entlang der optischen Achse – selektiv betrachtet und so dreidimensionale Bilder erzeugt. Diese Technik wird als *konfokale Mikroskopie* bezeichnet. Die Kombination der beiden Methoden, die *konfokale Fluoreszenzmikroskopie*, hat in den vergangenen zwanzig Jahren weitreichende, neue Erkenntnisse in der Zellbiologie ermöglicht [2]. Allerdings können die fluoreszierenden Moleküle ausbleichen oder die Markierung das zu untersuchende System stören.

Alternative Methoden zur Markierung von Proben basieren auf der Interferenz. Frits Zernike wurde für die Entwicklung des Phasenkontrastmikroskops 1953 der Physik-Nobelpreis verliehen [1]. Sowohl in der *Phasenkontrastmikroskopie* als auch in der *differenziellen Interferenzmikroskopie* wird statt der Lichtabsorption die Phase des Lichts zur Kontrastbildung genutzt. Hierbei führen eine variierende Schichtdicke und Brechungsindexunterschiede in der Probe zu einem Hell-Dunkel-Kontrast aufgrund konstruktiver und destruktiver Interferenz.

Mit der Entdeckung des Lasers in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts und der darauf folgenden Entwicklung von Ultrakurz-Puls-Lasern eröffnete sich ein neuer Bereich der Mikroskopie: die *nichtlinear optische Mikroskopie*. In fokussierten, ultrakurzen Laserpulsen werden Photonendichten erreicht, welche die simultane Absorption mehrerer Photonen in einem Probenmolekül ermöglichen. Abgesehen von der Mehr-Photonen angeregten Fluoreszenz wird die aufgenommene Ener-

gie durch Emission kohärenter Photonen wieder frei. Wegen der nichtlinearen Abhängigkeit der Effizienz von der anregenden Strahlung spricht man hier von nichtlinear optischen Frequenzkonversionsprozessen. Die Intensität der frequenzkonvertierten Strahlung führt dabei zu einem bildgebenden Kontrast. Aufgrund der geringen Konversionseffizienz finden diese Prozesse nur innerhalb des Fokusbereichs in einer detektierbaren Größenordnung statt. Dadurch wird auch ohne Lochblende die Aufnahme räumlich hochaufgelöster, dreidimensionaler Bilder ermöglicht. Die in der nichtlinear optischen Mikroskopie zugrundeliegenden, physikalischen Phänomene sind unabhängig von der bisher betrachteten Lichtabsorption und Lichtbrechung. Daher eignen sich die Methoden der kohärenten Frequenzkonversion auch zur Untersuchung ansonsten optisch unzugänglicher, transparenter Proben ohne Brechungsindexvariation. Bei den in der nichtlinear optischen Mikroskopie genutzten Phänomenen handelt es sich in der Regel um nicht-resonante Prozesse, die keine Energie in der Probe deponieren und ohne Zusatz von Markern funktionieren [3]. Eine Ausnahme bildet die *Mehr-Photonen angeregte Fluoreszenzmikroskopie* [3].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden Frequenzverdopplung und Frequenzverdreifung zur nichtlinear optischen Mikroskopie verwendet. Hierbei wird die Frequenzkonversion an Grenzschichten zwischen zwei Medien ausgenutzt. Neben den bereits genannten Vorteilen der nichtlinear optischen Mikroskopie zeichnet sich die Frequenzverdreifung dadurch aus, dass sie an allen Grenzflächen unabhängig vom Aggregatzustand der beteiligten Medien auftritt. Die auf der Frequenzverdopplung basierende Mikroskopie (engl.: *second harmonic generation microscopy*, SHM) wurde zuerst von Hellwarth und Christensen Mitte der 1970er Jahre zur Betrachtung dünner Kristalle verwendet [4]. Die Mikroskopie der Erzeugung der dritten Harmonischen (engl.: *third harmonic generation microscopy*, THM) wurde erstmals 1997 von Barad et al. zur Abbildung optischer Fasern ausgenutzt [5]. In den darauf folgenden Jahren haben diese beiden Mikroskopiemethoden zahlreiche Anwendungen in vielen Forschungsgebieten wie der Biologie [6–9], der Chemie [10, 11], der Materialwissenschaft [12, 13] und der Medizin [14–16] gefunden. Trotz dieser vielfältigen Anwendungen sind grundlegende Abhängigkeiten in der nichtlinear optischen Mikroskopie noch nicht vollständig untersucht und verstanden. In dieser Arbeit wird daher die Emission der frequenzverdoppelten und -verdreifachten Strahlung in der nichtlinear optischen Mikroskopie systematisch mittels numerischen Berechnungen und Experimenten untersucht. Hierbei werden transparente, heterogene Proben aus Materialien gleicher Brechungsindizes betrachtet, welche nicht durch die lineare Mikroskopie visualisiert werden können. Zudem wird die THM erstmals auf das Forschungsfeld der Mikrofluidik angewandt.

Die Arbeit ist in vier Kapitel untergliedert:

Das erste Kapitel beschäftigt sich mit den Grundlagen der nichtlinear optischen Mikroskopie. Hierbei wird durch intensive Lichtfelder eine nichtlineare Polarisierung des Mediums induziert. Dazu werden zwei Modelle zur Beschreibung fokussierter Laserstrahlung und der daraus resultierenden Polarisierung dargestellt. Zur Be-

rechnung der Frequenzkonversion aus der nichtlinearen Polarisation werden zwei weitere Modelle erläutert. Die gezeigten Gleichungen und Beziehungen bilden die Basis für alle nachfolgenden Simulationen.

Kapitel zwei beschäftigt sich mit dem experimentellen Aufbau. Hierbei wird zunächst das Lasersystem charakterisiert. Anschließend wird das in im Rahmen dieser Arbeit aufgebaute, nichtlinear optische Mikroskop erläutert und charakterisiert. Es besitzt zwei simultane Detektionskanäle für die Strahlung der zweiten und dritten harmonischen Frequenz zur dreidimensionalen Probenuntersuchung.

Der dritte Abschnitt stellt systematische Untersuchungen der Emissionscharakteristik der frequenzverdoppelten und der frequenzverdreifachten Strahlung vor. Es wird der Einfluss der Grenzflächenorientierung auf die Konversionseffizienz, die räumliche Auflösung und das Emissionsprofil systematisch untersucht. Die experimentellen Ergebnisse dieses Kapitels werden durch numerische Simulationen bestätigt.

Im letzten Kapitel wird die THM in zwei Experimenten auf das Gebiet der Mikrofluidik übertragen. Zu Beginn wird ein Überblick über die zum Verständnis der Mikrofluidik nötigen Grundlagen gegeben. Anschließend werden mikrofluidische Systeme mischbarer wie auch nicht-mischbarer Flüssigkeiten mit der nichtlinear optischen Mikroskopie untersucht. Die vorgestellten Experimente belegen das große Potential dieser erstmals in der Mikrofluidik angewandten Mikroskopiemethode.

## Kapitel 1

# Grundlagen der nichtlinear optischen Mikroskopie

Im Rahmen der nichtlinearen Optik wird die simultane Wechselwirkung mehrerer Photonen mit Materie beschrieben. Hierbei kommt es unter anderem zu kohärenten Frequenzkonversionsprozessen. Zu diesen Prozessen zählen die Frequenzverdopplung (engl.: *second harmonic generation*, SHG), die Summenfrequenzerzeugung (engl.: *sum frequency generation*, SFG), die Frequenzverdreifung (engl.: *third harmonic generation*, THG) oder die kohärente anti-Stokes-Raman-Streuung (engl.: *coherent anti-Stokes Raman scattering*, CARS) (siehe Abbildung 1.1).

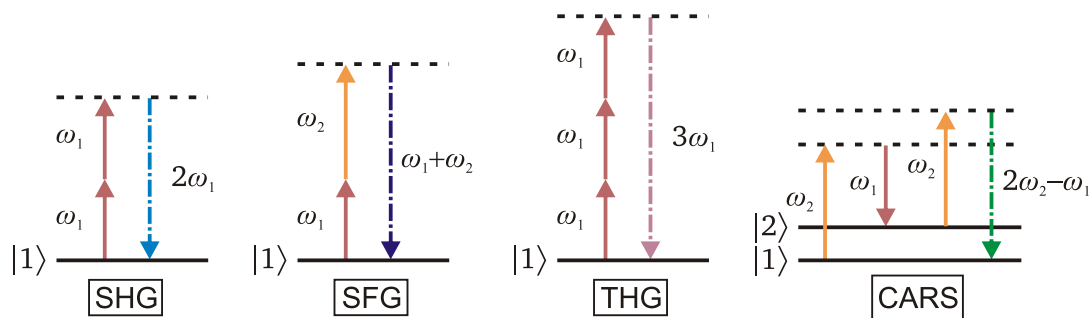


Abbildung 1.1: Auswahl kohärenter Frequenzkonversionsprozesse in einem Energieniveaudiaagramm. Hierbei werden die Energieniveaus  $|1\rangle$  und  $|2\rangle$  durch durchgezogene Linien sowie die virtuellen Energieniveaus durch gestrichelte Linien skizziert. Die durchgezogenen Pfeile stellen die eingestrahlt Laserfelder der Frequenzen  $\omega_1$  und  $\omega_2$  dar. Die emittierte Signalstrahlung wird jeweils durch den strichpunktierter Pfeil veranschaulicht. [17, 18]

Die genannten Frequenzkonversionsprozesse sind typischerweise erst bei hohen Feldstärken von Bedeutung. Daher blieb dieses Teilgebiet der Optik bis zur Entwicklung des Lasers unerforscht. Seitdem ist aufgrund des Fortschritts in der Herstellung von Kristallen hoher nichtlinear optischer Suszeptibilitäten (die als nichtlineare Medien dienen) sowie der Weiterentwicklung des Lasers zu höheren Intensitäten, die erreichbare Konversionseffizienz enorm gestiegen. Dadurch sind Anwendungen wie die Frequenzverdopplung Neodym-dotierter Festkörperlaser und breitbandig durchstimmbarer, optisch parametrischer Oszillatoren (engl.: *optical parametric oscillator*, OPO) heute weltweit in Laserlaboren zu finden.

Darüber hinaus ermöglicht die kohärente Frequenzkonversion ein neues Feld der Mikroskopie: die kohärente nichtlineare Mikroskopie (engl.: *coherent nonlinear microscopy*, CNM). Die CNM bietet vor allem einen optischen Zugang zu Pro-

ben, bei denen die Methoden der konventionellen, optischen Mikroskopie versagen. Dies gilt für transparente, heterogene Proben ohne starke Variation von Brechungsindizes (die zumindest das Verfahren der Phasenkontrast-Mikroskopie ermöglichen würde). Die Bestandteile solcher Proben sind durch ihre linearen optischen Eigenschaften nicht voneinander abgrenzbar. Im Gegensatz zu den linearen zeigen die nichtlinear optischen Eigenschaften typischerweise deutliche Variationen [19, 20]. Daher erreicht die CNM auch in solchen Proben einen bildgebenden Kontrast. Basierend auf den unterschiedlichen Frequenzkonversionsprozessen existieren vielfältige Mikroskopiemethoden der kohärenten nichtlinearen Mikroskopie. Dazu zählen unter anderem die SHG-Mikroskopie (SHM), die SFG-Mikroskopie, die THG-Mikroskopie (THM) und die CARS-Mikroskopie. Im Gegensatz zur SFG- und CARS-Mikroskopie benötigen die SHM und THM lediglich Licht einer einzigen Wellenlänge (siehe Abbildung 1.1). Daher sind diese beiden Mikroskopietechniken im Allgemeinen leichter zu implementieren.

Um die genannten Methoden näher zu beleuchten, werden in diesem Kapitel die mathematischen Grundlagen der nichtlinearen Optik bezüglich der SHM und THM und deren Simulation vorgestellt. Der Aufbau des Kapitels ist schematisch in Abbildung 1.2 dargestellt.

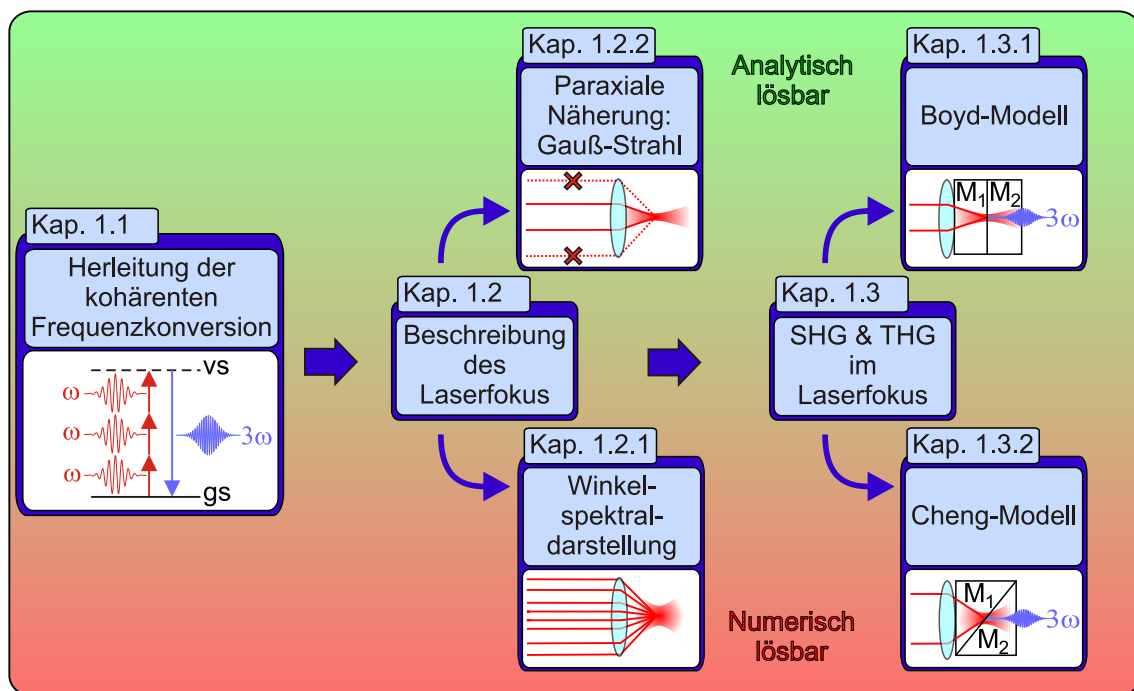


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Kapitelaufbaus.

Ausgehend von der durch ein intensives Lichtfeld induzierten Polarisation eines Mediums wird die Erzeugung harmonischer Lichtfelder erläutert. Hierbei wird besonders auf die mathematische Beschreibung des fokussierten, fundamentalen Laserfeldes eingegangen. Diese Beschreibung wird sowohl in paraxialer Näherung als auch in der Winkelspektraldarstellung diskutiert. Abschließend erfolgt die Berechnung der erzeugten, harmonischen Felder sowohl in einem Modell von Boyd

als auch in einem Modell von Cheng [17, 21]. Das Boyd-Modell ist eine Näherung für moderate Fokussierungen, ist analytisch lösbar und lässt sich einfach nachvollziehen. Die Winkelspektraldarstellung und das Cheng-Modell zur Berechnung der Frequenzkonversion sind abgesehen von Spezialfällen nur numerisch lösbar. Allerdings erlauben diese Ansätze auch die Betrachtung stark brechender Objektive beziehungsweise beliebig orientierter Grenzflächen.

## 1.1 Grundlagen der nichtlinearen Optik

Lichtfelder mit Feldstärken, die viel geringer sind als die Felder im Atom bzw. Molekül, induzieren in dielektrischen Medien am Ort  $\vec{r}$  zum Zeitpunkt  $t$  eine in guter Näherung lediglich lineare Polarisation  $\vec{P}^{(1)}(\vec{r}, t)$ . Diese ist proportional zur eingestrahlten elektrischen Feldstärke  $\vec{E}(\vec{r}, t)$  [22]

$$\vec{P}^{(1)}(\vec{r}, t) = \varepsilon_0 \chi^{(1)} \vec{E}(\vec{r}, t). \quad (1.1)$$

Hierbei bildet das Produkt der elektrischen Feldkonstante  $\varepsilon_0$  und der linearen Suszeptibilität  $\chi^{(1)}$  die Proportionalitätskonstante. Im Bereich der nichtlinearen Optik ist dieser lineare Zusammenhang nicht mehr gültig. Für intensive Lichtfelder wird die induzierte Polarisation des Mediums  $\vec{P}(\vec{r}, t)$  in einer Reihenentwicklung dargestellt

$$\vec{P}(\vec{r}, t) = \varepsilon_0 \left[ \chi^{(1)} \vec{E}(\vec{r}, t) + \chi^{(2)} (\vec{E}(\vec{r}, t))^2 + \chi^{(3)} (\vec{E}(\vec{r}, t))^3 + \dots \right]. \quad (1.2)$$

Die Koeffizienten  $\chi^{(q)}$  bezeichnen die Suszeptibilität  $q$ -ter Ordnung. Typischerweise werden deren Beträge mit steigender Ordnung schnell kleiner. Es handelt sich bei den Suszeptibilitäten um Tensoren  $(q + 1)$ -ter Stufe, die frequenz- und richtungsabhängige Materialkonstanten darstellen. Da im Rahmen dieser Arbeit eine feste Laserfrequenz genutzt wird, kann die Frequenzabhängigkeit der Suszeptibilitäten vernachlässigt werden. Für spätere Betrachtungen ist es sinnvoll die nichtlineare Polarisation  $q$ -ter Ordnung  $\vec{P}^{(q)}(\vec{r}, t)$  und den gesamten nichtlinearen Anteil der Polarisation  $\vec{P}^{NL}(\vec{r}, t)$  wie folgt zu definieren

$$\vec{P}^{(q)}(\vec{r}, t) = \varepsilon_0 \chi^{(q)} (\vec{E}(\vec{r}, t))^q \quad (1.3)$$

$$\text{und} \quad \vec{P}^{(NL)}(\vec{r}, t) = \sum_{q=2}^{\infty} \vec{P}^{(q)}(\vec{r}, t) \quad (1.4)$$

Durch Symmetriebetrachtungen lässt sich zeigen, dass in zentrosymmetrischen Medien die Suszeptibilitäten gerader Ordnung und damit die jeweiligen Polarisationen gerader Ordnungen verschwinden. Zu diesen Medien gehören alle isotropen Medien wie beispielsweise Gläser, Gase oder Flüssigkeiten. Aufgrund ihrer Symmetrie sind diese Medien invariant gegenüber einer Inversion der Ortskoordinaten. Durch eine mangelnde Vorzugsrichtung des Mediums ändern die Vektoren  $\vec{E}$  und  $\vec{P}^{(q)}$  bei der Ortsinversion lediglich ihr Vorzeichen zu  $\vec{E}' \stackrel{!}{=} -\vec{E}$  und



$\vec{P}^{(q)'} \stackrel{!}{=} -\vec{P}^{(q)}$ . Betrachtet man die Beziehung (1.3) für gerade Ordnungen  $\tilde{q}$ , so folgt daraus

$$-\vec{P}^{(\tilde{q})} \stackrel{!}{=} \vec{P}^{(\tilde{q})'}(\vec{E}') = \vec{P}^{(\tilde{q})'}(-\vec{E}) = \varepsilon_0 \chi^{(\tilde{q})}(-\vec{E})^{\tilde{q}} = \varepsilon_0 \chi^{(\tilde{q})}(\vec{E})^{\tilde{q}} = \vec{P}^{(\tilde{q})}. \quad (1.5)$$

Damit diese Gleichung erfüllt wird, muss  $\vec{P}^{(\tilde{q})}$  und damit  $\chi^{(\tilde{q})}$  verschwinden. Daher ist in zentrosymmetrischen Medien die nichtlineare Polarisation dritter Ordnung der niedrigste, nichtlinear optische Term, der auftreten kann [20, 23].

Das elektrische Feld  $\vec{E}$  der Laserstrahlung lässt sich durch den Ansatz einer ebenen Welle mit variabler Amplitude  $\vec{E}_f(\vec{r}, t)$  beschreiben

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}_f(\vec{r}, t) \cdot \exp[-i(\omega t - \vec{k}\vec{r})] + k.k., \quad (1.6)$$

wobei  $k.k.$  für das komplex Konjugierte der vorangegangenen Summanden,  $\omega$  für die Frequenz des Lichtfeldes und  $\vec{k}$  für den Wellenvektor stehen [24]. Fügt man diesen Ansatz in die Beziehungen für die Polarisation zweiter und dritter Ordnung ein, so erhält man

$$\vec{P}^{(2)}(\vec{r}, t) = \varepsilon_0 \chi^{(2)}(\vec{E}_f(\vec{r}, t))^2 \left[ 2 + e^{-i(2\omega t - 2\vec{k}\vec{r})} + k.k. \right] \quad (1.7)$$

$$\vec{P}^{(3)}(\vec{r}, t) = \varepsilon_0 \chi^{(3)}(\vec{E}_f(\vec{r}, t))^3 \left[ 3e^{-i(\omega t - \vec{k}\vec{r})} + e^{-i(3\omega t - 3\vec{k}\vec{r})} + k.k. \right]. \quad (1.8)$$

Der erste, frequenzunabhängige Term der Polarisation zweiter Ordnung ist für den Effekt der optischen Gleichrichtung verantwortlich. Der zweite Term beinhaltet eine Schwingung der doppelten Laserfrequenz  $2\omega$ . Somit oszillieren einige der Elektronen mit der doppelten Laserfrequenz um ihren Atom- bzw. Molekülumpf. Analog zum Hertz'schen Dipol führt dies zu einer Strahlungsemission mit der Frequenz der Ladungsträgeroszillation. Diese Strahlung wird als zweite Harmonische bezeichnet. Eine entsprechende Betrachtung gilt auch für die Polarisation dritter Ordnung. Der mit der Laserfrequenz  $\omega$  oszillierende Term führt zum nichtlinearen Brechungsindex. Relevant für eine Frequenzkonversion ist der Term, der mit der dreifachen Laserfrequenz  $3\omega$  schwingt. Diese Schwingung ist für die Emission der Strahlung der dritten Harmonischen verantwortlich. Die Beschreibung der Erzeugung neuer elektrischer Felder  $\vec{E}$  aus der Polarisation  $\vec{P}$  erfolgt durch die Wellengleichung im dielektrischen Medium [22]

$$\Delta \vec{E}(\vec{r}, t) - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \vec{E}(\vec{r}, t) = \frac{1}{\varepsilon_0 c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \vec{P}(\vec{r}, t). \quad (1.9)$$

Zusammen mit den Gleichungen (1.2) und (1.4) lässt sich dieser Ausdruck umschreiben zu

$$\Delta \vec{E}(\vec{r}, t) - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \vec{E}(\vec{r}, t) = \frac{1}{\varepsilon_0 c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \vec{P}^{(NL)}(\vec{r}, t). \quad (1.10)$$

Hier wurde zusätzlich die Definition des Brechungsindex  $n = \sqrt{1 + \chi^{(1)}}$  verwendet. Jede Funktion lässt sich mittels der Fourier-Transformation durch eine Reihe

von Frequenzkomponenten darstellen [24]. Die Frequenz-Komponenten der nichtlinearen Polarisation  $\vec{P}^{(NL)}$  und des elektrischen Feldes  $\vec{E}$  sind:

$$\vec{P}_{\omega^*}^{(NL)}(\vec{r}, t) = \vec{P}_{0,\omega^*}(\vec{r}, t) \cdot \exp[-i(\omega^* t - \vec{k}_{\omega^*} \vec{r})] + k.k. \quad (1.11)$$

und

$$\vec{E}_{\omega^*}(\vec{r}, t) = \vec{E}_{0,\omega^*}(\vec{r}, t) \cdot \exp[-i(\omega^* t - \vec{k}_{\omega^*} \vec{r})] + k.k.. \quad (1.12)$$

Da diese Frequenzkomponenten unabhängig voneinander sind, muss für jede Frequenz  $\omega^*$  Gleichung (1.10) erfüllt werden [24]. Die Zeitableitungen aus Gleichung (1.10) lassen sich dann in der Fourier-Darstellung lösen zu:

$$\begin{aligned} & \frac{\partial}{\partial t} \left[ \frac{\partial}{\partial t} \left( \vec{E}_{0,\omega^*}(\vec{r}, t) \cdot e^{-i(\omega^* t - \vec{k}_{\omega^*} \vec{r})} + k.k. \right) \right] = \\ & \frac{\partial}{\partial t} \left[ e^{-i(\omega^* t - \vec{k}_{\omega^*} \vec{r})} \cdot \left( \frac{\partial}{\partial t} \vec{E}_{0,\omega^*}(\vec{r}, t) - i\omega^* \vec{E}_{0,\omega^*}(\vec{r}, t) \right) + k.k. \right] \stackrel{SVEA}{\approx} \\ & \frac{\partial}{\partial t} \left[ -i\omega^* \vec{E}_{0,\omega^*}(\vec{r}, t) \cdot e^{-i(\omega^* t - \vec{k}_{\omega^*} \vec{r})} + k.k. \right] \stackrel{SVEA}{\approx} \\ & -(\omega^*)^2 \vec{E}_{0,\omega^*}(\vec{r}, t) \cdot e^{-i(\omega^* t - \vec{k}_{\omega^*} \vec{r})} + k.k. = -(\omega^*)^2 \vec{E}_{\omega^*}(\vec{r}, t). \end{aligned}$$

Hierbei wurde die physikalisch sinnvolle Annahme gemacht, die zeitliche Variation der einhüllenden Amplitude des Lichtfeldes langsam ist gegenüber der Lichtfrequenz (engl.: *slowly varying envelope approximation*, SVEA). Für die nichtlineare Polarisation lassen sich diese Schritte analog durchführen. Mit diesen Näherungen vereinfacht sich die Wellengleichung (1.10) für die Frequenz  $\omega^*$  zu

$$\Delta \vec{E}_{\omega^*}(\vec{r}, t) + k_{\omega^*}^2 \vec{E}_{\omega^*}(\vec{r}, t) = -\frac{(\omega^*)^2}{\epsilon_0 c^2} \vec{P}_{\omega^*}^{(NL)}(\vec{r}, t). \quad (1.13)$$

Hier wurde zusätzlich die Dispersionsrelation  $k_{\omega^*}^2 = |\vec{k}_{\omega^*}|^2 = (n_{\omega^*} \omega^* / c)^2$  verwendet.

Somit stellt die von einem fokussierten Laserfeld  $\vec{E}$  induzierte nichtlineare Polarisation  $\vec{P}^{(NL)}$  einen Quellterm für neue elektrische Felder  $\vec{E}_{\omega^*}$  der Frequenz  $\omega^*$  dar. Um die erzeugten Felder  $\vec{E}_{\omega^*}$  näher zu diskutieren, ist zunächst eine Beschreibung der Amplitude des fokussierten Laserfeldes  $\vec{E}$  nötig. Daher beschäftigt sich Kapitel 1.2 mit einer allgemeinen Darstellung des fokussierten Laserfeldes und einer Darstellung in paraxialer Näherung. Kapitel 1.3 beschreibt mit diesen Darstellungen die erzeugten Felder der zweiten und dritten harmonischen Frequenz.

## 1.2 Mathematische Beschreibung fokussierter Laserstrahlung

Die folgenden, mathematischen Beschreibungen beschränken sich auf zeitlich konstante Laserintensitäten, d.h. es wird die mittlere Intensität in einem Lichtpuls betrachtet. Dies reduziert die Rechenzeit der sehr umfangreichen und zeitintensiven,

numerischen Simulation auf Integration über räumliche Variationen der Laserintensität. Die Vernachlässigung der zeitlichen Variation der Lichtintensität ist bei den eingesetzten ultrakurzen Lichtpulsen gerechtfertigt, da die üblichen Detektoren in der nichtlinear optischen Mikroskopie diese zeitliche Variation nicht auflösen können. Die Propagation des Lichts in Raum und Zeit wird weiterhin durch den Term  $\exp[-i(\omega t - \vec{k}\vec{r})]$  beschrieben. In der gesamten vorliegenden Arbeit wird die  $z$ -Achse als optische Achse gewählt. Somit beschreiben die  $x$ - und  $y$ -Achse die transversalen Richtungen des Lichtfeldes.

### 1.2.1 Winkelspektraldarstellung

Die in der Laserphysik konventionelle Behandlung des elektrischen Feldes in paraxialer Näherung ist für die nichtlinear optische Mikroskopie nur bedingt verwendbar. In dieser Näherung betrachtet man nur die Strahlengänge, welche einen geringen Abstand und Winkel zur optischen Achse aufweisen. Bei der Verwendung von sehr stark brechenden Objektiven mit hohen numerischen Aperturen weisen vor allem die Randstrahlen einen sehr großen Winkel  $\theta$  zur optischen Achse auf. Daher ist eine geeignetere Beschreibung des stark fokussierten Lichtfeldes nötig. Dies erfolgt im Rahmen der Winkelspektraldarstellung (engl.: *angular spectrum representation*) [25]. Im Folgenden wird eine kurze Erläuterung dieses Modells gegeben. Details können der Literatur entnommen werden [25]. Bei der Winkelspektraldarstellung wird von der Fokussierung durch einen Aplanaten ausgegangen. Aplanate stellen Linsensysteme dar, bei denen weder sphärische Aberration noch Koma als Abbildungsfehler auftreten. Da bei Aplanaten kein Asymmetriefehler entsteht, muss die Abbe'sche Sinusbedingung erfüllt sein [26]. Als Folge der erfüllten Abbe'schen Sinusbedingung sind die Hauptebenen eines Aplanaten gekrümmt und als Kugelflächen gegeben. Die Fokussierung parallel zur optischen Achse einfallender Lichtstrahlen durch einen Aplanaten lässt sich daher durch die Brechung an einer kugelförmigen Referenzoberfläche mit dem Radius der Brennweite  $f$  beschreiben. Das transversale Profil des eingestrahnten, elektrischen Feldes  $\vec{E}_L(x, y)$  wird als normalverteilt angenommen

$$\vec{E}_L(x, y) = E_{f,0} e^{-\frac{x^2+y^2}{w^2}} \vec{e}_x = E_{f,0} e^{-\frac{\rho^2}{w^2}} \vec{e}_x = E_{f,0} e^{-\frac{f^2}{w^2} \cdot \sin^2 \theta} \vec{e}_x = E_{f,0} f_0(\theta) \vec{e}_x \quad (1.14)$$

mit dem Laserstrahlradius  $w$ . Die lineare Polarisation des Feldes zeigt in Richtung der  $x$ -Achse. Hierbei wird abgekürzt:

$$f_0(\theta) = \exp[-f^2/w^2] \cdot \sin^2 \theta.$$

Abbildung 1.3 veranschaulicht die Geometrie der Winkelspektraldarstellung. Aufgrund der gegebenen Symmetrie wird der Ortsraum im Fokus in Zylinderkoordinaten beschrieben. Novotny und Hecht zeigten, dass sich das elektrische Feld im Fokus  $\vec{E}_f(\vec{r}) = \vec{E}_f(\rho, \phi, z)$  durch die Berücksichtigung des Brechungsgesetzes für jeden durch das Linsensystem propagierenden Strahlengang wie folgt ergibt:

$$\vec{E}_f(\rho, \phi, z) = \frac{ik_\omega f_0}{2} E_{f,0} e^{-ik_\omega f_0} \begin{pmatrix} (I_{00}(\rho, z) + I_{02}(\rho, z) \cos 2\phi) \vec{e}_x \\ I_{02}(\rho, z) \sin 2\phi \vec{e}_y \\ -2iI_{01}(\rho, z) \cos \phi \vec{e}_z \end{pmatrix} \quad (1.15)$$

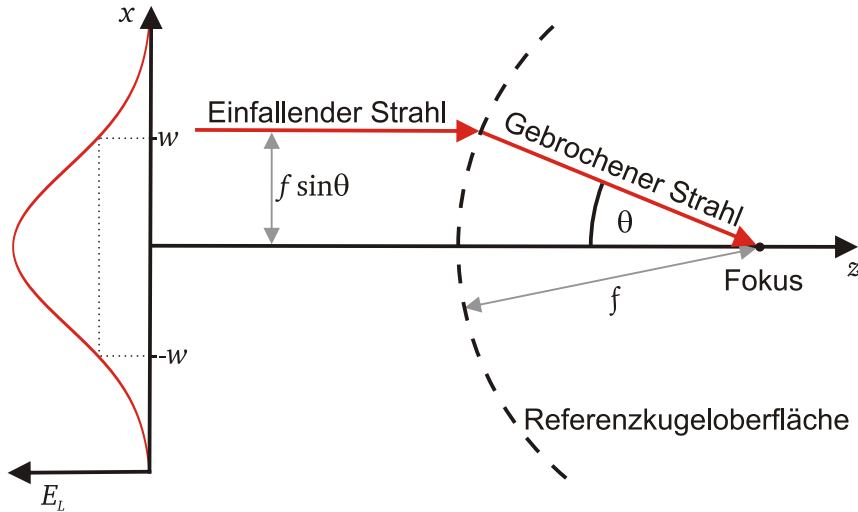


Abbildung 1.3: Zur Erläuterung der Winkelspektraldarstellung: Das transversale Profil der elektrischen Feldamplitude  $E_L = |\vec{E}_L|$  ist normalverteilt mit dem 1/e-Radius  $w$  (linker Graph). Durch den Winkel  $\theta$  zwischen dem jeweils gebrochenen Strahl und der optischen Achse lassen sich alle relevanten Strahlengänge beschreiben. Der transversale Abstand zur optischen Achse lässt sich mit  $f \sin \theta$  berechnen, wobei  $f$  die Brennweite und somit den Radius der Referenzkugeloberfläche darstellt (Aplanat). Die Brechung der Strahlen findet an dieser Referenzkugeloberfläche statt.

Der Fokuswinkel  $\theta$  zur Strahlachse liegt im Intervall von 0 bis  $\theta_{\max} = \arcsin(NA_F/n_\omega)$ . Die numerische Apertur  $NA_F$  ist dabei durch die Linse vorgegeben. In den Hilfsfunktionen  $I_{00}$ ,  $I_{01}$  und  $I_{02}$  wird über die zu berücksichtigen Strahlengänge integriert

$$I_{00}(\rho, z) = \int_0^{\theta_{\max}} f_0(\theta) (\cos \theta)^{1/2} \sin \theta (1 + \cos \theta) J_0(k_\omega \rho \sin \theta) e^{ik_\omega z \cos \theta} d\theta,$$

$$I_{01}(\rho, z) = \int_0^{\theta_{\max}} f_0(\theta) (\cos \theta)^{1/2} \sin^2 \theta J_1(k_\omega \rho \sin \theta) e^{ik_\omega z \cos \theta} d\theta,$$

$$I_{02}(\rho, z) = \int_0^{\theta_{\max}} f_0(\theta) (\cos \theta)^{1/2} \sin \theta (1 - \cos \theta) J_2(k_\omega \rho \sin \theta) e^{ik_\omega z \cos \theta} d\theta.$$

$J_m$  ist die Besselfunktion  $m$ -ter Ordnung.

Im Gegensatz zum unfokussierten Feld  $\vec{E}_L$  weist die elektrische Feldamplitude im Fokus  $\vec{E}_f$  in der Winkelspektraldarstellung je eine nicht verschwindende Komponenten in  $y$ - und  $z$ -Richtung auf. Exemplarisch zeigt Abbildung 1.4 den Betrag  $E_f = |\vec{E}_f|$  für die Laserfokussierung durch ein Objektiv der numerischen Apertur  $NA_F = 0,22$  und der Brennweite  $f = 16 \text{ mm}$ . Das dargestellte elektrische Feld hat eine longitudinale Halbwertsbreite von  $62,5 \mu\text{m}$  und eine transversale Halbwertsbreite von  $3 \mu\text{m}$ . Definiert man hier eine Fokusfläche bei halber Maximalamplitude würde sich näherungsweise eine Ellipse mit einem Aspektverhältnis von 1 : 21 ergeben. In drei Raumrichtungen würde man ein zigarrenförmiges Fokusvolumen

erhalten. Diese Verteilung der elektrischen Feldamplitude aus der Winkelspektraldarstellung wird im nächsten Abschnitt mit der Beschreibung in paraxialer Näherung verglichen.

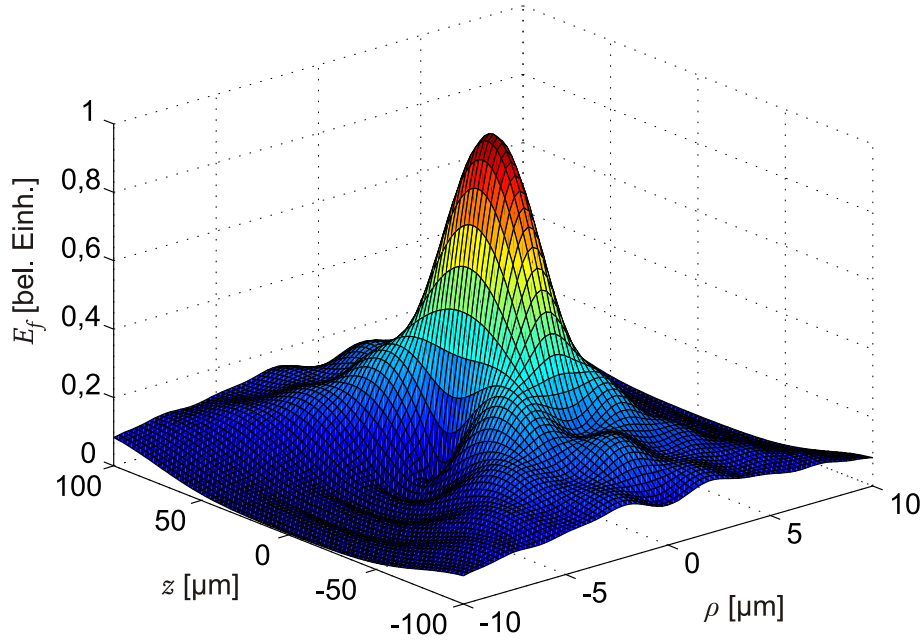


Abbildung 1.4: Absolutbetrag der elektrischen Feldamplitude  $E_f = |\vec{E}_f|$  eines Laserfokus in Abhängigkeit der transversalen und longitudinalen Dimensionen  $\rho$  und  $z$ . Die Berechnung erfolgte mit der Winkelspektraldarstellung. Das verwendete Objektiv hat eine numerische Apertur  $NA_F = 0,22$  und eine Brennweite  $f = 16$  mm.

### 1.2.2 Paraxiale Näherung

In der paraxialen Näherung werden kleine Änderungen der Feldamplitude eines Lichtfeldes in transversaler Richtung angenommen. Der Gauß-Strahl ist eine Lösung der paraxial genäherten Wellengleichung und bildet das Verbindungsglied zwischen der Strahlen- und der Wellenoptik. Ähnlich wie bei einer ebenen Welle geht man hier davon aus, dass die Ausbreitungsrichtung im Wesentlichen entlang der optischen Achse liegt. Im Gegensatz zur ebenen Welle ist beim Gauß-Strahl die Amplitude räumlich nicht konstant. Somit ergibt sich folgender Ansatz für das elektrische Feld und die daraus resultierende nichtlineare Polarisation

$$\vec{E}_{\omega^*}(\vec{r}, t) = \vec{E}_{0, \omega^*}(\vec{r}, t) e^{-i(\omega^* t - k_{\omega^*} z)} \quad (1.16)$$

$$\vec{P}_{\omega^*}^{(NL)}(\vec{r}, t) = \vec{P}_{0, \omega^*}^{(NL)}(\vec{r}, t) e^{-i(\omega^* t - k'_{\omega^*} z)}. \quad (1.17)$$

Hierbei wurde in der nichtlinearen Polarisation eine zum elektrischen Feld verschiedene Wellenzahl  $k'_{\omega^*}$  verwendet, um die Dispersion des Mediums zu berücksichtigen. Wie bei der Winkelspektraldarstellung wird eine zeitlich konstante Lichtamplitude  $\vec{E}_{0, \omega^*}(\vec{r}, t) = \vec{E}_{0, \omega^*}(\vec{r})$  betrachtet. Setzt man diese Ansätze in die

nichtlineare Wellengleichung (1.13) ein, erhält man mit der Operator-Identität  $\Delta = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} = \vec{\nabla}_T^2 + \frac{\partial^2}{\partial z^2}$

$$\vec{\nabla}_T^2 \vec{E}_{\omega^*}(\vec{r}) + \left( \frac{\partial^2 \vec{E}_{0,\omega^*}(\vec{r})}{\partial z^2} + 2ik_{\omega^*} \frac{\partial \vec{E}_{0,\omega^*}(\vec{r})}{\partial z} \right) e^{-i(\omega^* t - k_{\omega^*} z)} = -\frac{(\omega^*)^2}{\epsilon_0 c^2} \vec{P}_{\omega^*}^{(NL)}(\vec{r}). \quad (1.18)$$

In der paraxialen Näherung sind die räumlichen Oszillationen des elektrischen Feldes wesentlich schneller als die Änderung der Amplitude (SVEA). Daher gilt

$$k_{\omega^*}^2 |\vec{E}_{0,\omega^*}(\vec{r})| \gg k \left| \frac{\partial \vec{E}_{0,\omega^*}(\vec{r})}{\partial z} \right| \gg \left| \frac{\partial^2 \vec{E}_{0,\omega^*}(\vec{r})}{\partial z^2} \right|.$$

Mit dieser Näherung lässt sich Gleichung (1.18) zur paraxialen, nichtlinearen Wellengleichung

$$\vec{\nabla}_T^2 \vec{E}_{0,\omega^*}(\vec{r}) + 2ik_{\omega^*} \frac{\partial \vec{E}_{0,\omega^*}(\vec{r})}{\partial z} = -\frac{(\omega^*)^2}{\epsilon_0 c^2} \vec{P}_{0,\omega^*}^{(NL)}(\vec{r}) \cdot e^{i\Delta k z} \quad (1.19)$$

mit der Phasenfehlanpassung  $\Delta k = k'_{\omega^*} - k_{\omega^*}$  vereinfachen. Gleichung (1.29) dient als Grundlage für die numerischen Simulationen in Kapitel 3.

Der Gauß-Strahl (siehe Abbildung 1.6) zur Beschreibung der frei propagierenden fundamentalen Laserstrahlung ist eine Lösung der homogenen, paraxialen Wellengleichung

$$\vec{\nabla}_T^2 \vec{E}_{0,\omega^*}(\vec{r}) + 2ik_{\omega^*} \frac{\partial \vec{E}_{0,\omega^*}(\vec{r})}{\partial z} = 0. \quad (1.20)$$

Das elektrische Feld sei in  $x$ -Richtung polarisiert. Der Gauß-Strahl wird beschrieben durch

$$\vec{E}_{0,\omega^*}(\vec{r}) = \vec{E}_{0,\omega^*}(\rho, \varphi, z) = A_{0,\omega^*} \frac{w_0}{w(z)} e^{\frac{-\rho^2}{w(z)^2}} e^{\frac{ik_{\omega^*}\rho^2}{2R'(z)}} e^{i\Phi'(z)} \vec{e}_x. \quad (1.21)$$

Hierbei bezeichnet  $A_{0,\omega^*}$  die Amplitude und  $w_0$  die minimale Strahltaille. Der transversale Durchmesser (d.h. die Strahltaille) ändert sich während der Propagation des Strahls gemäß

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left( \frac{z}{\tilde{z}} \right)^2}. \quad (1.22)$$

Hierbei ist  $\tilde{z}$  die Rayleigh-Länge mit der Wellenlänge  $\lambda$  definiert:

$$\tilde{z} = \pi w_0^2 / \lambda. \quad (1.23)$$

Die Rayleigh-Länge beschreibt die Propagationsstrecke bis zur Verdopplung des Strahlquerschnitts. Dies dient als Maß für die longitudinale Ausdehnung des Fokus. Neben der transversalen Ausdehnung ändert sich auch der Krümmungsradius  $R'(z)$  der Wellenfronten gemäß

$$R'(z) = z \left( 1 + \left( \frac{\tilde{z}}{z} \right)^2 \right). \quad (1.24)$$

Die Phase  $\Phi'$  des Gauß-Strahls erfährt bei dessen Propagation durch die minimale Strahltaile eine Inversion gemäß

$$\Phi'(z) = -\arctan\left(\frac{z}{\tilde{z}}\right). \quad (1.25)$$

Diese Phasenverschiebung ist als Gouy-Phase bekannt. In der Fernfeldnäherung ergibt sich der Divergenzwinkel:

$$\theta = \frac{\lambda}{\pi w_0}. \quad (1.26)$$

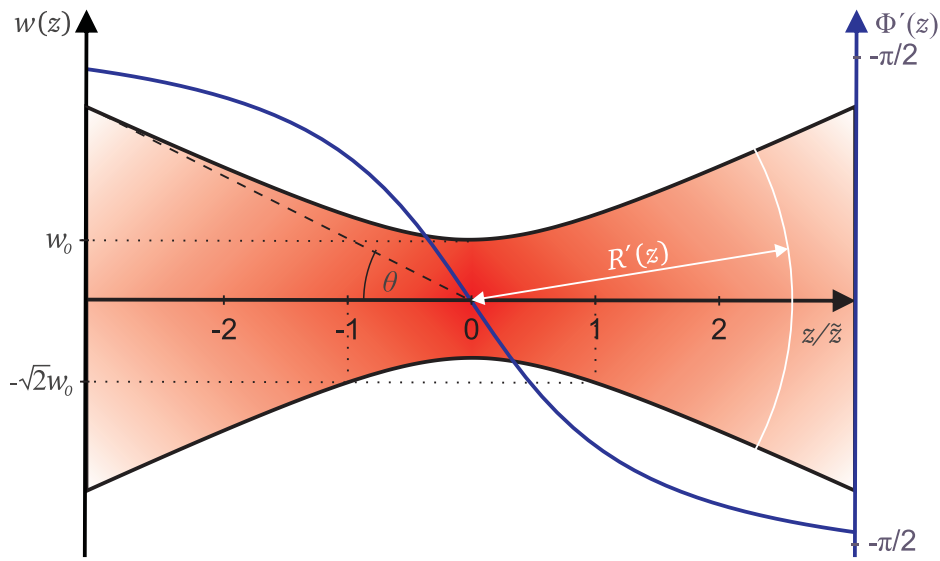


Abbildung 1.5: Darstellung eines Gauß-Strahls. Die transversale Ausdehnung  $w(z)$  des Gauß-Strahls ist in Schwarz (linke Ordinatenachse) gegen den Abstand zum Fokus in Einheiten der Rayleigh-Länge  $\tilde{z}$  aufgetragen. Für das Fernfeld ergibt sich der Divergenzwinkel  $\theta$ . Exemplarisch ist in Grau eine Phasenfront und deren Krümmungsradius  $R'(z)$  eingezeichnet. Der blaue Verlauf stellt die Phase  $\Phi'(z)$  des Gauß-Strahls dar (rechte Ordinatenachse).

Alternativ zu Gleichung (1.21) kann der Gauss-Strahl auch in komplexer Schreibweise etwas kompakter dargestellt werden:

$$\vec{E}_{0,\omega^*}(\vec{r}) = \vec{E}_{0,\omega^*}(\rho, \varphi, z) = \frac{A_{0,\omega^*}}{1 + iz/\tilde{z}} \exp\left[-\frac{\rho^2}{w_0^2(1 + iz/\tilde{z})}\right] \vec{e}_x. \quad (1.27)$$

Der komplexen Darstellung folgend, lässt sich das fokussierte Lichtfeld der Frequenz  $\omega$  formulieren zu:

$$\vec{E}_f(\rho, \varphi, z) = \vec{E}_{0,\omega}(\rho, \varphi, z) = \frac{A_{0,\omega}}{1 + iz/\tilde{z}} \exp\left[-\frac{\rho^2}{w_0^2(1 + iz/\tilde{z})}\right] \vec{e}_x. \quad (1.28)$$

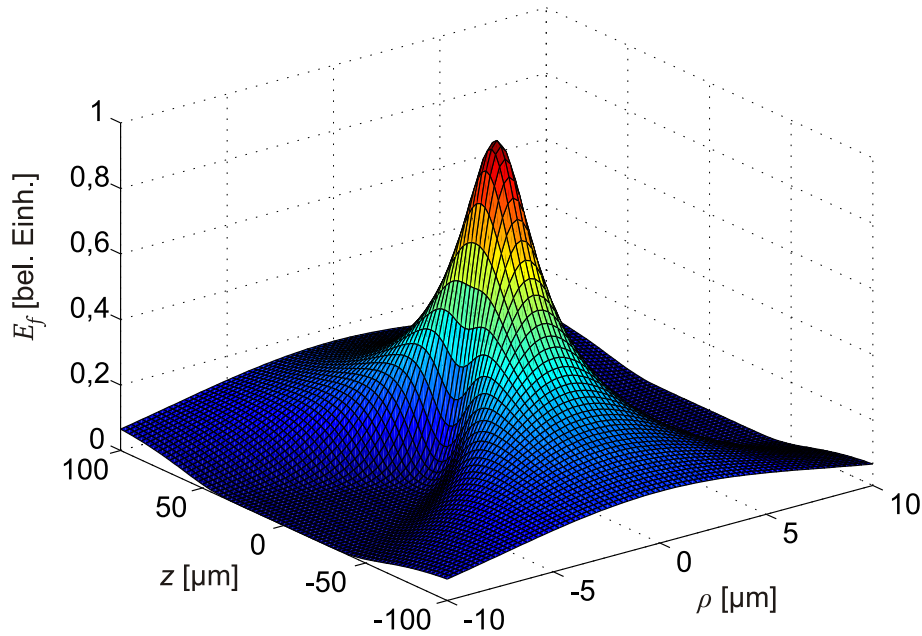


Abbildung 1.6: Absolutbetrag der elektrischen Feldamplitude in paraxialer Näherung  $E_f = |\vec{E}_f|$  eines Laserfokus in Abhängigkeit der transversalen und longitudinalen Dimension  $\rho$  und  $z$ . Das verwendete Objektiv hat eine numerische Apertur  $NA_F = 0,22$  und eine Brennweite  $f = 16$  mm.

Exemplarisch zeigt Abbildung 1.6 den Betrag des elektrischen Feldes  $E_f = |\vec{E}_f|$  in paraxialer Näherung für die Fokussierung durch ein Objektiv der numerischen Apertur  $NA_F = 0,22$  und der Brennweite  $f = 16$  mm. Ein Vergleich dieser Abbildung mit jener der Winkelspektraldarstellung (Abbildung 1.4) zeigt einen ähnlichen Verlauf. Es ergeben sich hier die Halbwertsbreiten zu  $55,5 \mu\text{m}$  in longitudinaler und  $2,8 \mu\text{m}$  in transversaler Richtung. Diese Werte sind etwa 10% geringer als jene der Winkelspektraldarstellung. Das Aspektverhältnis liegt bei  $1 : 19,8$ . Quadriert man das elektrische Feld und bestimmt daraus das Aspektverhältnis der Intensität, erhält man ein Verhältnis von  $1 : 18,2$ . Zudem zeigt der Gauß-Strahl weniger Strukturen im Randbereich. Da die Frequenzkonversion hauptsächlich bei maximaler Amplitude auftritt, sind die fehlenden Strukturen am Rand nur von geringer Bedeutung. Insgesamt beschreibt die paraxiale Näherung (bzw. der Gauß-Strahl) bei den vorliegenden experimentellen Parametern die Feldstärkeverteilung im Fokus recht gut. Die mathematische Handhabung sowie der zeitliche Aufwand bei der numerischen Simulation sind beim Gauß-Strahl um ein Vielfaches besser als bei der Winkelspektraldarstellung. Bei größerer numerischer Apertur wird die Approximation des elektrischen Feldes durch den Gauß-Strahl zunehmend schlechter werden. In diesen Fällen ist die Verwendung der Winkelspektraldarstellung notwendig.



### 1.3 Frequenzkonversion im Laserfokus

Die oben erläuterten Darstellungen eines fokussierten Lichtstrahls sollen jetzt in der Beschreibung der Frequenzverdopplung und -verdreifachung angewandt werden. Um eine analytische Lösung zu erhalten, wird die Beschreibung des fokalen Lichtfeldes durch den Gauß-Strahl und die paraxiale Näherung verwendet. Dieser Ansatz ermöglicht es relevante Schlüsse für die nichtlineare Mikroskopie zu ziehen.

#### 1.3.1 Erzeugung harmonischer Frequenzen im Boyd-Modell

Im Folgenden wird ein fokussierter Gauß-Strahl in einem nichtlinear optischen Medium betrachtet. Es wird der allgemeine Fall der Frequenzkonversion zur  $q$ -ten Harmonischen behandelt.

In dem von Boyd gezeigten Modell der Frequenzkonversion betrachtet man die paraxiale Wellengleichung (1.29) für die Frequenz  $\omega^* = q\omega$  mit der Definition der nichtlinearen Polarisation aus Gleichung (1.3), so erhält man die Differentialgleichung [17]

$$\vec{\nabla}_T^2 \vec{E}_{0,q\omega}(\vec{r}) + 2ik_{q\omega} \frac{\partial \vec{E}_{0,q\omega}(\vec{r})}{\partial z} = -\frac{(q\omega)^2 \chi^{(q)}}{c^2} (\vec{E}_{0,\omega}(\vec{r}))^q \cdot e^{i\Delta k z}. \quad (1.29)$$

Hierbei wird die Polarisation durch ein Feld der Frequenz  $\omega^* = \omega$  induziert. Ward und New zeigten, dass sich daraus mit einem Gauß-Strahl nach Gleichung (1.27) als fundamentales Feld und dem Ansatz

$$\vec{E}_{0,q\omega}(\rho, \varphi, z) = \frac{A_{0,q\omega}(z)}{1 + iz/\tilde{z}} \exp\left[-\frac{q\rho^2}{w_0^2(1 + iz/\tilde{z})}\right] \vec{e}_x \quad (1.30)$$

die Amplitude des erzeugten Feldes  $A_{0,q\omega}(z)$  bestimmen lässt zu [17, 27]

$$A_{0,q\omega}(z) = \frac{iq\omega}{2\varepsilon_0 n_{q\omega} c} \chi^{(q)} A_{0,\omega}^q \int_{z_0}^z \frac{\exp[i\Delta k z']}{(1 + iz'/\tilde{z})^{q-1}} dz'. \quad (1.31)$$

Hierbei steht  $z_0$  für die Eintrittsposition des Lichtfeldes in das Medium. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden stets Medien betrachtet, deren Ausdehnungen groß sind gegenüber der Rayleigh-Länge, d.h. der longitudinalen Ausdehnung des Fokus. Die Feldamplitude der  $q$ -ten Harmonischen lässt sich daher näherungsweise schreiben:

$$A_{0,q\omega} = \frac{iq\omega}{2\varepsilon_0 n_{q\omega} c} \chi^{(q)} A_{0,\omega}^q \int_{-\infty}^{\infty} \frac{\exp[i\Delta k z']}{(1 + iz'/\tilde{z})^{q-1}} dz'. \quad (1.32)$$

Dieses komplexe Integral lässt sich analytisch mittels des Residuensatzes [27, 28] lösen zu

$$A_{0,q\omega} = \frac{iq\omega}{2\varepsilon_0 n_{q\omega} c} \cdot \chi^{(q)} A_{0,\omega}^q \begin{cases} 0 & , \text{für } \Delta k < 0 \\ \frac{2\pi}{(q-2)!} \tilde{z}^{q-1} \Delta k^{q-2} \exp(-\tilde{z} \Delta k) & , \text{für } \Delta k > 0. \end{cases} \quad (1.33)$$

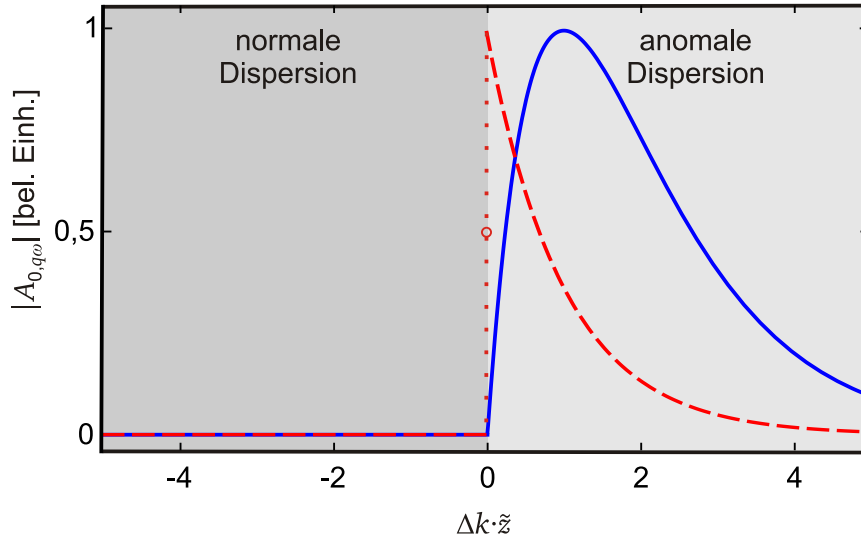


Abbildung 1.7: Normierte Feldamplitude der erzeugten Harmonischen nach Gleichung (1.33) für  $q = 2$  (gestrichelte rote Kurve) und  $q = 3$  (blaue Kurve). Hierbei ist der jeweils normierte Betrag der Amplitude  $|A_{0,q\omega}|$  gegen die Phasenfehlanpassung  $\Delta k$  in Einheiten der Rayleigh-Länge  $\tilde{z}$  aufgetragen. Negative (positive) Phasenfehlanpassung ergibt sich bei normaler (anomaler) Dispersion des Mediums. THG und SHG treten nur im Fall anomaler Dispersion ( $\Delta k > 0$ ) auf. Für eine perfekte Phasenanpassung verschwindet die dritte Harmonische, während die zweite Harmonische die halbe Maximalamplitude aufweist.

Dabei ist die Phasenfehlanpassung  $\Delta k = \frac{q\omega}{c}(n_\omega - n_{q\omega})$  gegeben durch die Differenz der Wellenvektoren der nichtlinearen Polarisation  $k'_{q\omega} = q * \frac{n_\omega \omega}{c}$  und des elektrischen Feldes der  $q$ -ten Harmonischen  $k_{q\omega} = \frac{n_{q\omega} q \omega}{c}$ . Die Wellenvektoren unterscheiden sich lediglich aufgrund der Dispersion des Mediums. Abbildung 1.7 zeigt die Amplituden der zweiten bzw. dritten Harmonischen aufgetragen gegen die Phasenfehlanpassung  $\Delta k$ . Für eine geringe positive Phasenfehlanpassung sind die Amplituden der zweiten und dritten Harmonischen maximal und nähern sich für große Phasenfehlanpassung asymptotisch der Null. Die positive Phasenfehlanpassung gilt für anomale Dispersion. Anomale Dispersion tritt nur in der Nähe von Resonanzen auf. Im Rahmen dieser Arbeit werden ausschließlich transparente Proben untersucht. Die optischen Übergangsfrequenzen solcher Proben liegen weit außerhalb des Spektralbereichs der verwendeten Laserstrahlung wie auch der erzeugten Harmonischen. Im Bereich der normalen Dispersion ( $n_\omega \leq n_{q\omega}$ ) bzw. negativer Phasenfehlanpassung verschwindet die Amplitude  $A_{0,q\omega}$ . Daher ist in den hier betrachteten Medien normaler Dispersion keine Erzeugung von harmonischen Frequenzen zu erwarten. Eine anschauliche Erläuterung dazu ist beispielhaft für die Erzeugung der dritten harmonischen Frequenz in Abbildung 1.8 (links) dargestellt. Im Medium  $M_1$  ist neben dem bereits aus Abbildung 1.5 bekannten Gauß-Strahl zur Orientierung der Betrag der Amplitude der dritten Harmonischen  $|A_{0,3\omega}(z)|$  aus Gleichung (1.31) für  $z_0 = -\infty$  aufgetragen. Dessen Verlauf wächst monoton bis zum Fokus ( $z = 0$ ) aufgrund der stetig steigenden Intensität an. Nach dem Fokus fällt die Amplitude im gleichen Maße wieder bis auf Null ab. Dies ist

mit der Phaseninversion des Gauß-Strahls (Gouy-Phasenverschiebung) im Fokus und der daraus resultierenden vollständig destruktiven Interferenz der erzeugten harmonischen Wellen zu erklären [5]. Somit kann bereits wenige Rayleigh-Längen hinter dem Fokus kein Signal harmonischer Frequenzen nachgewiesen werden.

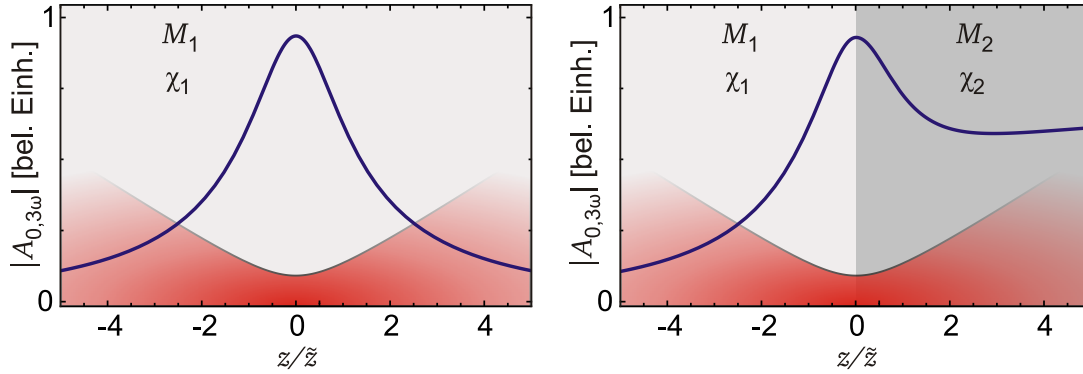


Abbildung 1.8: Analytische Berechnung des Betrags der Amplitude der dritten Harmonischen  $|A_{0,3\omega}(z)|$  nach Gleichung (1.31) (blaue Kurve). Zur besseren Übersicht über die Ausdehnung des Bereichs ist die transversale Ausdehnung des Gauß-Strahls in Rot dargestellt. (links) Der Verlauf der Amplitude bei der Fokussierung in ein homogenes Medium  $M_1$  der nichtlinearen Suszeptibilität  $\chi_1^{(3)}$  und (rechts) in eine heterogene Probe bestehend aus den Medien  $M_1$  und  $M_2$  (mit  $\chi_1^{(3)}$  und  $\chi_2^{(3)} = 0,3 \chi_1^{(3)}$ ).

In einem heterogenen Medium ändert sich jedoch die nichtlinear optische Polarisation an der Grenzfläche. Dies führt nicht zu einer vollständigen Auslöschung der erzeugten Harmonischen, sondern zu einer partiell destruktiven Interferenz. Diese Situation ist in Abbildung 1.8 (rechts) dargestellt. Für das neue Medium  $M_2$  wird ebenfalls vollständige Transparenz und ein zum ersten Medium  $M_1$  identischer Brechungsindex angenommen. Diese Medien wären mittels der konventionellen (linearen) Mikroskopie nicht voneinander abgrenzbar. Im Gegensatz zu den linear optischen Eigenschaften unterscheiden sich die nichtlinear optischen Eigenschaften typischerweise deutlich voneinander [19, 29, 30]. Dies spiegelt sich in den willkürlich gewählten Suszeptibilitäten  $\chi_1^{(3)}$  und  $\chi_2^{(3)} = 0,3 \chi_1^{(3)}$  wider. Aufgrund der lediglich partiellen Auslöschung bleibt im Fernfeld ( $z \rightarrow \infty$ ) eine nicht verschwindende Strahlung der harmonischen Frequenz erhalten.

Die im Boyd-Modell diskutierten Eigenschaften der Frequenzkonversion an Grenzflächen ermöglichen die nichtlinear optische mikroskopische Abbildung heterogener Proben. Bei der Fokussierung eines intensiven Laserstrahls in ein homogenes Medium findet keine detektierbare Erzeugung von harmonischen Frequenzen statt. Liegt hingegen eine Grenzfläche zweier Medien im Bereich des Laserfokus, führt dies zu einer detektierbaren Frequenzkonversion. Die Mikroskopie mittels Frequenzvervielfachung ist somit Grenzflächen-sensitiv und liefert Informationen über die Probenstruktur. Dies gelingt auch bei transparenten Proben ohne Brechungsindexvariation, welche durch die Methoden der linearen Optik nicht zugänglich sind.

Es sei angemerkt, dass das oben diskutierte Boyd-Modell auf der Analyse der Frequenzkonversion im Rahmen der paraxialen Näherung basiert. Aufgrund der auf die longitudinale Dimension limitierten Abhängigkeit der erzeugten Feldamplitude kann die Frequenzkonversion nur an orthogonal zur optischen Achse verlaufenden Grenzflächen simuliert werden. Daher wird im nächsten Abschnitt ein komplexerer Ansatz vorgestellt. Dieser Ansatz ist weniger anschaulich, ermöglicht aber Simulationen an beliebigen Grenzflächenorientierungen.

### 1.3.2 Erzeugung harmonischer Frequenzen im Cheng-Modell

Im vorangegangenen Abschnitt wurde die nichtlineare Suszeptibilität als Skalar angesetzt und die transversalen Änderungen der Felder vernachlässigt. Beide Annahmen sind für die nichtlinear optische Mikroskopie nur für moderate Fokussierungen zulässig. Um eine allgemeingültigere Formulierung zu erhalten, wird in diesem Abschnitt das Modell von Cheng betrachtet [21]. Da die Erzeugung der dritten Harmonischen das zentrale Thema dieser Arbeit bildet, wird speziell deren Erzeugung im Cheng-Modell behandelt. Die Erzeugung der zweiten Harmonischen lässt sich analog dazu beschreiben. Aus Gleichung (1.3) und mit der nichtlinearen Suszeptibilität dritter Ordnung als Tensor vierter Stufe lässt sich die Polarisation dritter Ordnung formulieren zu

$$\vec{P}^{(3)}(\vec{r}) = \epsilon_0 \sum_{i,j,k,l} \vec{e}_i \chi_{ijkl}^{(3)}(\vec{r}) E_j(\vec{r}) E_k(\vec{r}) E_l(\vec{r}). \quad (1.34)$$

Im Rahmen dieser Arbeit werden typischerweise zentrosymmetrische Medien wie Gläser oder Flüssigkeiten betrachtet. Aufgrund dieser Symmetrie vereinfacht sich die Suszeptibilität dritter Ordnung zu [31]

$$\chi_{ijkl}^{(3)} = \sum_{i,j,k,l} \chi_0^{(3)} (\delta_{ij} \delta_{kl} + \delta_{ik} \delta_{jl} + \delta_{il} \delta_{jk}), \quad (1.35)$$

mit dem Kronecker-Delta  $\delta_{ij}$  ( $\delta_{ij} = 1$  für  $i = j$ ,  $\delta_{ij} = 0$  sonst) und der material- und frequenzabhängigen Konstante  $\chi_0^{(3)}$ . Damit erhält man

$$\vec{P}^{(3)} = \epsilon_0 \chi_0^{(3)} \begin{pmatrix} E_x(3E_x^2 + E_y^2 + E_z^2) \\ E_y(E_x^2 + 3E_y^2 + E_z^2) \\ E_z(E_x^2 + E_y^2 + 3E_z^2) \end{pmatrix}. \quad (1.36)$$

Um aus der nichtlinearen Polarisation dritter Ordnung das Feld der dritten Harmonischen zu berechnen, ist die inhomogene, lineare Differentialgleichung der Helmholtz-Gleichung (1.13) zu lösen. Da die erzeugte Strahlung am Detektor, also im Fernfeld  $\vec{R} = (R, \Theta, \Phi)$ , von Interesse ist, lässt sich das Feld der dritten Harmonischen durch die tensorielle Green-Funktion  $\hat{G} = G_{ij} \vec{e}_i \otimes \vec{e}_j$  beschreiben [25]

$$\vec{E}^{(3\omega)}(\vec{R}) = \int_V dV' \hat{G}(\vec{R}, \vec{r}') \vec{P}^{(3\omega)}(\vec{r}') = \int_V dV' \vec{e}_i G_{ij}(\vec{R}, \vec{r}') P_j^{(3\omega)}(\vec{r}'). \quad (1.37)$$

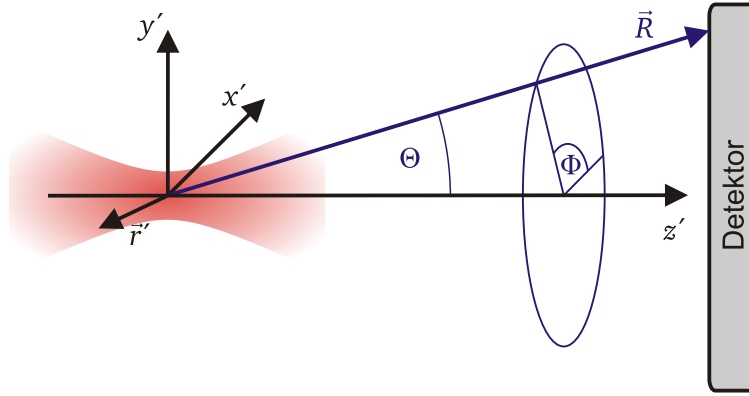


Abbildung 1.9: Koordinatensysteme und Orientierung der vorliegenden Geometrie. Der Ortsvektor  $\vec{R} = (R, \Theta, \Phi)$  in Kugelkoordinaten beschreibt das Fernfeld am Ort der Detektion. Der Vektor  $\vec{r}'$  liegt im Fokusvolumen  $V$ . Die Gesamtleistung  $\Pi^{(3\omega)}$  entspricht der Summe aller auf den Detektor treffenden Strahlen der dritten Harmonischen. Ein ortsauflösender Detektor könnte die Intensität  $I^{(3\omega)}$  einzelner Strahlbündel der dritten Harmonischen in einer Richtung  $(\Theta, \Phi)$  vermessen.

Die Integration erfolgt über das Fokusvolumen  $V$ , in dem die dritte Harmonische erzeugt wird. Die Komponenten der tensoriellen Green-Funktion sind hierbei definiert als

$$G_{ij}(\vec{R}, \vec{r}') = \left( \delta_{ij} - \frac{1}{k_{3\omega}^2} \vec{\nabla}'_i \vec{\nabla}'_j \right) G_0(\vec{R}, \vec{r}'). \quad (1.38)$$

Die skalare Green-Funktion  $G_0$  ist gegeben durch

$$G_0(\vec{R}, \vec{r}') = \frac{1}{4\pi} \frac{e^{ik_{3\omega}|\vec{R}-\vec{r}'|}}{|\vec{R}-\vec{r}'|}. \quad (1.39)$$

Abbildung 1.9 gibt einen Überblick über die Koordinatensysteme und Geometrie des Cheng-Modells. In der Fernfeldnäherung  $|\vec{R}| \gg |\vec{r}'|$  lässt sich Gleichung (1.39) mit dem Einheitsvektor  $\vec{N} = \vec{R}/|\vec{R}|$  vereinfachen zu

$$G_0(\vec{R}, \vec{r}') \simeq \frac{e^{ik_{3\omega}R}}{4\pi R} e^{-ik_{3\omega}\vec{N} \cdot \vec{r}'}. \quad (1.40)$$

Führt man in dieser Näherung die Ableitungen in der tensoriellen Green-Funktion aus, so lassen sich die einzelnen Elemente  $G_{ij}$  umschreiben zu

$$G_{ij} = (\delta_{ij} - N_i N_j) G_0 = A_{ij} G_0. \quad (1.41)$$

Die Elemente  $A_{ij} = \delta_{ij} - N_i N_j$  sind in kartesischen Koordinaten mit  $\vec{R} = (X, Y, Z)$  und  $|\vec{R}| = R$  somit gegeben durch

$$\hat{A} = \begin{pmatrix} 1 - X^2/R^2 & -XY/R^2 & -XZ/R^2 \\ -XY/R^2 & 1 - Y^2/R^2 & -YZ/R^2 \\ -XZ/R^2 & -YZ/R^2 & 1 - Z^2/R^2 \end{pmatrix}. \quad (1.42)$$

Durch Einsetzen in die Bestimmungsgleichung für das elektrische Feld der dritten Harmonischen (1.37) ergibt sich

$$\vec{E}^{(3\omega)}(\vec{R}) = \frac{e^{ik_{3\omega}R}}{4\pi R} \vec{e}_i A_{ij} \int_V dV' e^{-ik_{3\omega}\vec{N}\cdot\vec{r}'} P_j^{(3\omega)}(\vec{r}'). \quad (1.43)$$

Dieser Ausdruck für das elektrische Feld der dritten harmonischen Frequenz ist sowohl gültig für ein fundamentales Laserfeld beschrieben durch einen Gauß-Strahl (für moderat brechende Objektive) als auch für die Winkelspektraldarstellung (für stark brechende Objektive). Im Gegensatz zum zuvor vorgestellten Boyd-Modell, findet hier eine Integration über alle drei Raumrichtungen statt, so dass beliebige Grenzflächenorientierungen simuliert werden können. Die Integrale sind im Allgemeinen nicht analytisch lösbar, daher müssen bei Simulationen mit diesem Ansatz numerische Verfahren eingesetzt werden. Die Gesamtleistung  $\Pi^{(3\omega)}$  ist dann gegeben durch [22]

$$\Pi^{(3\omega)} = \frac{\varepsilon_0 c}{2} \int_0^{2\pi} d\Phi \int_0^{\Theta_{\max}} d\Theta R^2 \sin \Theta |\vec{E}^{(3\omega)}(\vec{R})|^2, \quad (1.44)$$

wobei der maximale Detektionswinkel  $\Theta_{\max}$  durch den Abstand und die Apertur des Detektors festgelegt ist und das Fernfeld  $\vec{R} = (R, \Theta, \Phi)$  in Kugelkoordinaten dargestellt wird. Über den Zusammenhang zwischen optischer Leistung und Intensität

$$\Pi^{(3\omega)} = \int I^{(3\omega)}(\Omega) d\Omega = \iint \sin \Theta I^{(3\omega)}(R, \Theta, \Phi) d\Theta d\Phi \quad (1.45)$$

erhält man die winkelaufgelöste Intensität der frequenzverdreifachten Strahlung

$$I^{(3\omega)}(R, \Theta, \Phi) = \frac{\varepsilon_0 c}{2} R^2 |\vec{E}^{(3\omega)}(\vec{R})|^2. \quad (1.46)$$

Verwendet man bei den Elementen  $A_{ij}$  ebenfalls die Darstellung in Kugelkoordinaten, folgt der vom Beobachtungsabstand  $R$  unabhängige Ausdruck

$$\hat{A} = \begin{pmatrix} 1 - \sin^2 \Theta \cos^2 \Phi & -\sin^2 \Theta \sin \Phi \cos \Phi & -\sin \Theta \cos \Theta \cos \Phi \\ -\sin^2 \Theta \sin \Phi \cos \Phi & 1 - \sin^2 \Theta \sin^2 \Phi & -\sin \Theta \cos \Theta \sin \Phi \\ -\sin \Theta \cos \Theta \cos \Phi & -\sin \Theta \cos \Theta \sin \Phi & 1 - \cos^2 \Theta \end{pmatrix}. \quad (1.47)$$

Es zeigt sich, dass die Intensität der emittierten Strahlung  $I^{(3\omega)}$  gemäß der Erwartung lediglich von der Beobachtungsrichtung  $(\Theta, \Phi)$  und nicht vom Beobachtungsabstand  $R$  abhängt

$$I^{(3\omega)}(\Theta, \Phi) = \frac{\varepsilon_0 c}{2} \left| \frac{\vec{e}_i A_{ij}}{4\pi} \int_V dV' e^{-ik_{3\omega}\vec{N}\cdot\vec{r}'} P_j^{(3\omega)}(\vec{r}') \right|^2. \quad (1.48)$$

Gleichung (1.48) stellt die in der numerischen Simulation auszuwertende Funktion des Intensitätsprofils der dritten Harmonischen dar (siehe Kapitel 3). Abbildung 1.10 vergleicht das zuvor vorgestellte Boyd-Modell der Frequenzkonversion

mit dem in diesem Abschnitt vorgestellten Modell nach Cheng. Während im Boyd-Modell nur orthogonal zur optischen Achse verlaufende Grenzflächen betrachtet werden können, erlaubt das hier vorgestellte Cheng-Modell die Betrachtung beliebig orientierter Grenzflächen. Zusätzlich zur Gesamtleistung  $\Pi^{(3\omega)}$  gibt das Cheng-Modell auch Aufschluss über das zweidimensionale Abstrahlungsprofil  $I^{(3\omega)}(\Theta, \Phi)$  der dritten Harmonischen. Das Abstrahlungsprofil wird in Kapitel 3 experimentell untersucht und mit Simulationen der Integral-Gleichung verglichen. Details zur numerischen Simulation von Gleichung (1.48) sind dem Anhang A zu entnehmen.

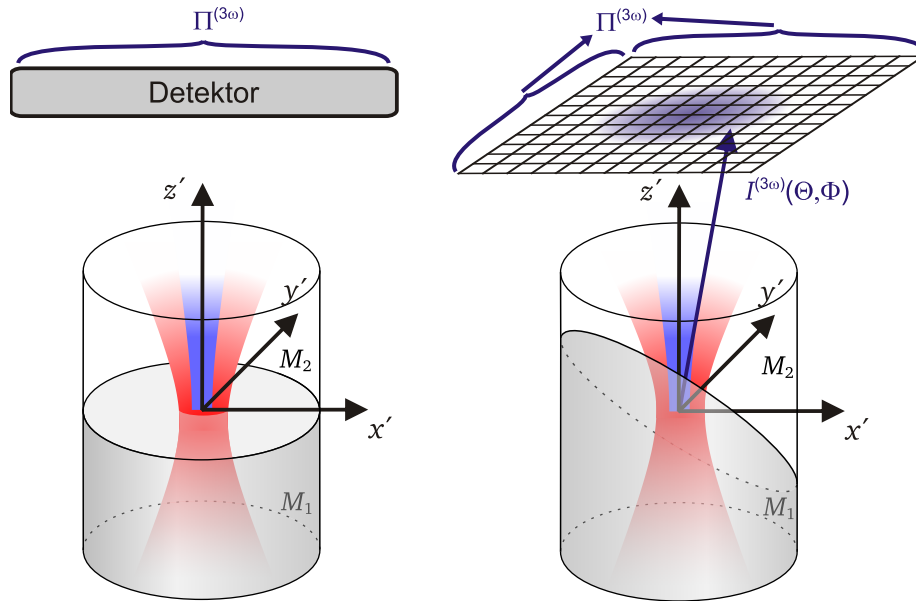


Abbildung 1.10: Darstellung der beiden in diesem Unterkapitel gezeigten mathematischen Modelle der Frequenzkonversion an Grenzschichten. (links) Das Boyd-Modell (Kapitel 1.3.1). (rechts) Das in diesem Abschnitt vorgestellte Modell nach Cheng.

## Kapitel 2

# Aufbau des nichtlinear optischen Mikroskops

In diesem Kapitel wird der im Rahmen dieser Arbeit entstandene, experimentelle Aufbau im Detail präsentiert und charakterisiert. Eine zentrale Voraussetzung für die bei der nichtlinear optischen Mikroskopie ausgenutzten, nichtlinear optischen Effekte ist eine ausreichend hohe Laserintensität. Hierzu wird gepulste Laserstrahlung verwendet. In der nichtlinear optischen Mikroskopie wird typischerweise gepulste Laserstrahlung mit Pulsdauern im Femto- bis Pikosekundenbereich verwendet. Verglichen mit Dauerstrichlasern liegt bei ultrakurzen Laserpulsen die Zerstörschwelle im Medium viel höher und die nichtlinear optischen Prozesse sind aufgrund der großen Spitzenintensitäten stärker. Aufgrund der hohen Repetitionsraten solcher Ultrakurz-Puls-Laser werden ausreichend viele frequenzvervielfachte Photonen erzeugt. Zur weiteren Steigerung der Intensität und der Auflösung wird die Strahlung fokussiert. Dies führt zu einer grenzflächenselektiven Strahlungskonversion. Wird der Laserfokus durch die Probe bewegt und die erzeugte frequenzvervielfachte Strahlung detektiert, so lassen sich die Grenzflächen der Medien und somit die Struktur der Probe rekonstruieren.

In diesem Kapitel wird zunächst das gepulste Lasersystem charakterisiert. Anschließend wird der Aufbau des nichtlinear optischen Mikroskops mit zwei simultanen Detektionskanälen für die Strahlung der zweiten Harmonischen (SH) und dritten Harmonischen (TH) erläutert und charakterisiert.<sup>1</sup>

## 2.1 Das Lasersystem

Das verwendete Lasersystem besteht aus zwei kommerziellen Festkörperlaser: ein Titan:Saphir-Laser (Spectra-Physics, Tsunami) und ein frequenzverdoppelter Neodym:Yttriumorthovanadat-Laser (Coherent, Verdi G7). Bei dem Verdi G7 handelt es sich um einen Laserdioden-gepumpten Dauerstrichlaser, der nach interner Frequenzverdopplung eine Wellenlänge von 532 nm mit einer maximalen, optischen Leistung von 7 W emittiert. Mit dieser Strahlung wird der gepulste Titan:Saphir-Laser optisch gepumpt. Die Laserpulse des Tsunami mit Pulsdauern im Femtosekunden-Bereich werden typischerweise für die Zwei-Photonen angeregte Fluoreszenz-Mikroskopie (engl.: *two-photon excitation fluorescence microscopy*, TPEF-Mikroskopie) verwendet und eignen sich daher gut für die nichtlinear optische Mikroskopie. Die relevanten Parameter des Ultra-Kurzpuls-Lasers sind Tabelle 2.1 entnehmbar.

---

<sup>1</sup>Teile der Ergebnisse dieses Kapitels sind im Rahmen der Masterarbeit von Florian Wagner entstanden, die vom Autor mit betreut wurde [28].



Pumpleistung $P_{\text{pump}}$	=	5,5 W
Durchschnittliche Ausgangsleistung $P$	=	1 W
Repetitionsrate $\nu_{\text{Rep}}$	=	82 MHz
Horizontaler, unfokussierter Strahldurchmesser $D_{h,\text{FWHM}}$	=	726 $\mu\text{m}$
Vertikaler, unfokussierter Strahldurchmesser $D_{v,\text{FWHM}}$	=	967 $\mu\text{m}$
Spektrale Halbwertsbreite $\Delta\lambda$	=	15,4 nm
Zentralwellenlänge $\lambda$	=	810 nm
Fourier-limitierte Pulsdauer $\Delta t_{\text{TBP}}$	=	44,9 fs
Pulsdauer hinter Laserresonator $\Delta t_{\text{Laser}}$	=	72,7 fs
Pulsdauer im Fokus $\Delta t_{\text{Fokus}}$	=	139,6 fs
Pulsenergie $E_{\text{Puls}} = P/\nu_{\text{Rep}}$	=	12 nJ
Pulsleistung im Fokus $P_{\text{Fokus}} = E_{\text{Puls}}/\Delta t_{\text{Fokus}}$	=	90 kW
Fokusintensität $I_{\text{Fokus}} = P_{\text{Puls}}/A_{\text{Fokus}}$	=	2 TW/cm <sup>2</sup>

Tabelle 2.1: Relevante Parameter des verwendeten Ultra-Kurzpuls-Lasers. Bei der Berechnung der Pulsleistung im Fokus wurden sämtliche Verluste vernachlässigt und ein stufenförmiger Laserpuls angenommen. Bei der Bestimmung der Fokusintensität wird eine Fokusfläche von  $A_{\text{Fokus}} = 4 \mu\text{m}^2$  angesetzt.

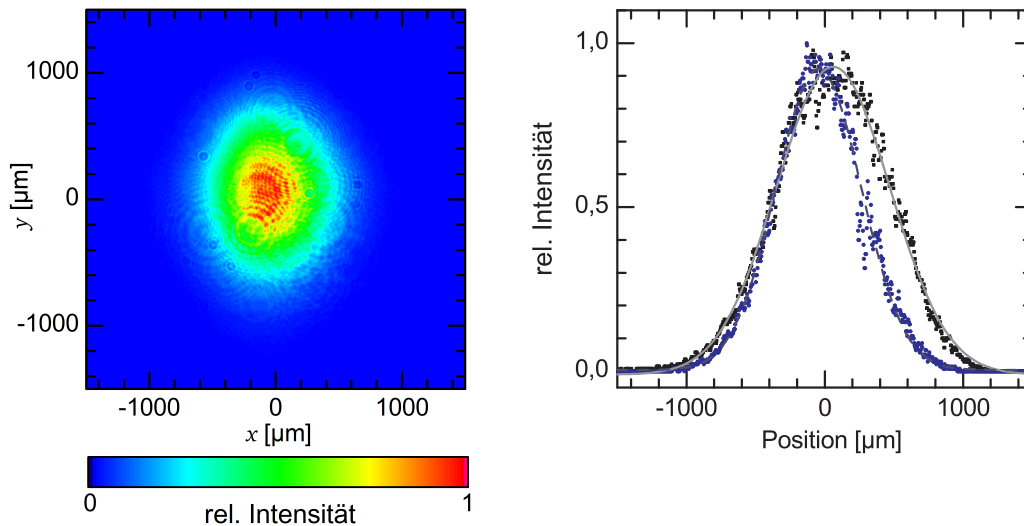


Abbildung 2.1: (links) Nach dem Auskoppelspiegel des Ultra-Kurzpuls-Lasers gemessenes Strahlprofil in Falschfarbendarstellung. (rechts) Gemessene Intensität eines horizontalen Schnitts (blaue Punkte) und eines vertikalen Schnitts (schwarze Quadrate) durch das Strahlprofil. An die Datenpunkte wurde jeweils eine Gauß-Funktion angepasst (dunkelblaue, gestrichelte Kurve an den horizontalen Schnitt, graue Kurve an den vertikalen Schnitt). Im Strahlprofil sind Interferenzstrukturen zu erkennen, die durch die Verwendung von Absorptionsfiltern vor dem Kamerachip verursacht werden.

Das vermessene Strahlprofil des Titan:Saphir-Lasers ist in Abbildung 2.1 in Falschfarbendarstellung gezeigt. Ebenfalls in dieser Abbildung sind je ein vertikaler und ein horizontaler Schnitt durch das Strahlprofil dargestellt. Der in der  $x$ -Richtung polarisierte Laser weist ein leicht elliptisches Strahlprofil auf. Die Halbwertsbreite entlang der  $x$ -Achse ist 726  $\mu\text{m}$ , während die Halbwertsbreite in  $y$ -Richtung

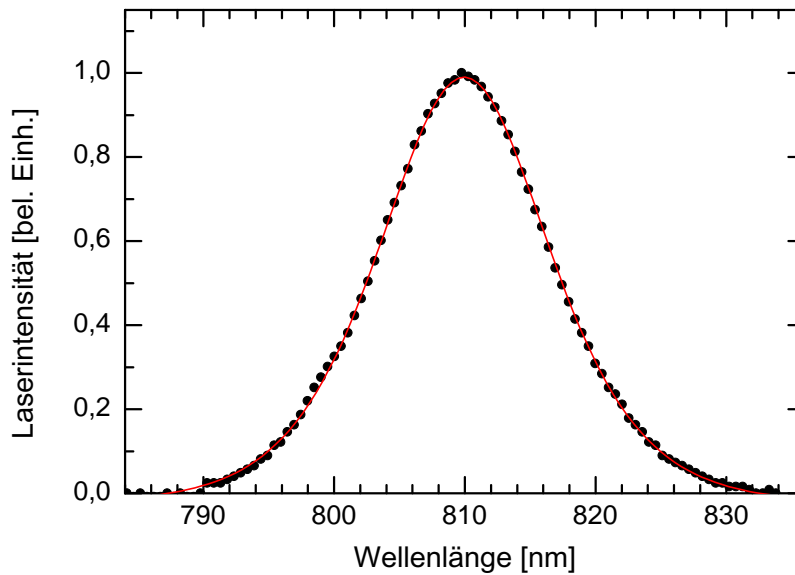


Abbildung 2.2: Emissionsspektrum des Titan:Saphir-Lasers. Das Spektrum wurde mit einem Laserspektrum-Analysator (Heraeus Noblelight, E201) aufgenommen (schwarze Punkte). Die spektrale Auflösung des Geräts wird mit 0,5 nm angegeben. An die Messwerte wurde zur Bestimmung der spektralen Halbwertsbreite eine quadratische Sekans-Hyperbolicus-Kurve angepasst (rote Linie). Die angepasste Funktion weist eine Halbwertsbreite von  $\Delta\lambda = 15,4$  nm auf.

967  $\mu\text{m}$  beträgt. Diese Werte wurden jeweils über die Anpassung einer Gauß-Funktion an die gezeigten Schnitte ermittelt. Damit ergibt sich ein Aspektverhältnis des Strahlprofils von 1 : 1,33. Im Vergleich zu anderen transversalen Moden ermöglicht die hier gemessene, transversale Grundmode  $\text{TEM}_{00}$  einen minimalen Fokus [26, 32].

Durch die Superposition phasenstarrer Schwingungsmoden des breitbandigen Emissionsspektrums des Tsunami entsteht ein oszillierender Lichtpuls im Resonator. Die Repetitionsrate der Lichtpulse ist hierbei durch die Resonatorausdehnung bestimmt zu 82 MHz. Je mehr Frequenzen in der Superposition enthalten sind, desto kürzer können die Laserpulse sein. Dieses Verfahren zur Erzeugung ultrakurzer Laserpulse wird als Modenkopplung (engl.: *mode locking*) bezeichnet. Die Zentralwellenlänge des emittierten Frequenzkamms kann zwischen 720 nm und 850 nm variiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird eine Zentralwellenlänge von  $\lambda = 810$  nm bei einer mittleren Ausgangsleistung von 1 W verwendet.

Das Emissionsspektrum der verwendeten Laserstrahlung ist in Abbildung 2.2 dargestellt. Die spektrale Halbwertsbreite lässt sich durch die Anpassung eines quadratischen Sekans-Hyperbolicus zu  $\Delta\lambda = 15,4$  nm bestimmen [33]. Das Spektrum des Frequenzkamms ist über die Fourier-Transformation mit der zeitlichen Pulsform verbunden. Mit der Frequenzbandbreite  $\Delta\nu$  ( $\approx \Delta\lambda c \lambda^{-2}$ ) lässt sich die zeitliche Halbwertsbreite eines Fourier-limitierten Pulses  $\Delta t_{\text{TBP}}$  über das Zeit-

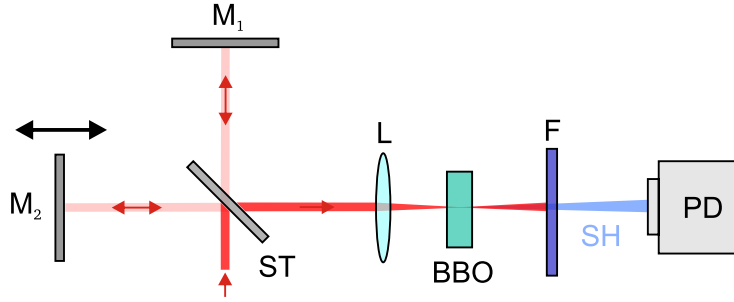


Abbildung 2.3: Aufbau des kollinearen, untergrundbehafteten Michelson-Interferometers zur Messung der Autokorrelation der Laserpulse. Folgende Abkürzungen wurden zur Bezeichnung der Optiken verwandt:  $M_1$  und  $M_2$  (Dielektrische Breitbandspiegel, Thorlabs, BB1-E03), ST (Strahlteiler, Qioptiq, G344203000), L (Linse, Thorlabs, LB1945-B), BBO (Beta-Bariumborat-Kristall, Döhler Elektrooptik, Schnittwinkel  $\theta = 28,9^\circ$ , SHG Typ I, Dicke  $300 \mu\text{m}$ ), F (Farbglassfilter, Thorlabs, FGB37M), PD (Photodiode, Thorlabs, SM05PD1A),

Bandbreiten-Produkt (engl.: *time-bandwidth product*, TBP) [34]

$$\Delta t_{\text{TBP}} \cdot \Delta \nu = 0,315 \quad (2.1)$$

zu  $\Delta t_{\text{TBP}} = 44,9 \text{ fs}$  berechnen. Der numerische Wert 0,315 gilt hierbei für einen Laserpuls, dessen Form durch einen quadratischen Sekans-Hyperbolicus beschrieben wird [33]. Diese Pulsdauer  $\Delta t_{\text{TBP}}$  stellt das theoretische Minimum für das gegebene Emissionsspektrum dar. Dieser Wert wird erreicht, wenn alle Frequenzen des Frequenzkamms sich synchron und ohne zusätzlichen Phasen- oder Frequenz-Jitter überlagern. Die reale Pulsdauer nach dem Laserresonator und nach dem Mikroskop wurde jeweils mittels einer Autokorrelationsmessung ermittelt. Dazu wurde ein linearer, untergrundbehafteter Michelson-Interferometer aufgebaut (siehe Abbildung 2.3). Hierbei werden zwei Teilstrahlen in einem frequenzverdoppelnden Kristall (BBO) überlagert. Durch Änderung der geometrischen Weglänge einer der beiden Teilstrahlen werden die Laserpulse relativ zueinander verzögert. Die Intensität der dabei emittierten, frequenzverdoppelten Strahlung ist in Abbildung 2.4 gegen die Pulsverschiebung der Laserpulse aufgetragen. Die Substruktur der Datenpunkte zeigt deutlich die durch die mit der Wellenlänge oszillierende Phase bedingte Interferenz. Durch Anpassung an eine quadratischen Sekans-Hyperbolicus-Funktion lässt sich die Halbwertsbreite der Autokorrelation nach dem Laserresonator zu  $\Delta t_{\text{AC, Laser}} = 112 \text{ fs}$  und nach dem Mikroskop zu  $\Delta t_{\text{AC, Mik}} = 215 \text{ fs}$  bestimmen. Der Autokorrelationsverlauf  $S_{\text{AC}}(t)$  wird durch die Faltung der Intensitätseinhüllenden (quadratische Sekans-Hyperbolicus-Funktion  $\text{Sech}^2$ ) mit sich selbst beschrieben:

$$S_{\text{AC}}(t) = \int_{-\infty}^{\infty} \text{Sech}^2(\tau) \cdot \text{Sech}^2(t - \tau) d\tau. \quad (2.2)$$

Dadurch ergibt sich ein Verhältnis der Halbwertsbreiten des Autokorrelationsverlaufs  $\Delta t_{\text{AC, Laser}}$  zur Halbwertsbreite der Intensitätseinhüllenden  $\Delta t_{\text{Laser}}$  von 1,54

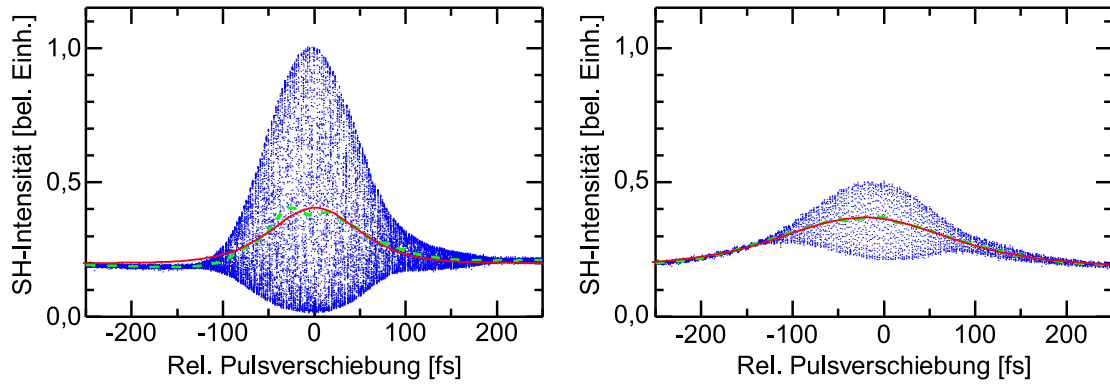


Abbildung 2.4: Autokorrelationsverlauf  $S_{AC}(t)$  des Titan:Saphir-Lasersystems. (links) Direkt nach dem Laserresonator (rechts) nach dem Mikroskop. Die Daten (blaue Punkte) wurden mit einem kollinearen Autokorrelator (siehe Abbildung 2.3) aufgenommen. Die grün gestrichelte Kurve zeigt den mittels eines 100pt-FFT-Tiefpassfilters geglätteten Verlauf. Der rote Verlauf stellt die Anpassung einer quadratischen Sekans-Hyperbolicus-Funktion dar. Die Pulsdauer nach dem Laserresonator liegt innerhalb der Spezifikation von  $< 80$  fs [33]. Aufgrund einer geringen Laufungenauigkeit bei der Verschiebung wird der theoretisch erreichbare Kontrast von 1:8 nicht erreicht. Zudem bedingt der Kondensor ein ungleichförmiges Strahlprofil in der Messung des rechten Graphen. Relevante Parameter der Messung (links): Abtastrate (4 kHz), Verschiebegeschwindigkeit ( $8,9407 \mu\text{m/s}$ ). Relevante Parameter der Messung (rechts): Abtastrate (12 kHz), Verschiebegeschwindigkeit ( $178,814 \mu\text{m/s}$ ).

[35]. Die gemessenen Pulsdauern resultieren damit zu  $\Delta t_{\text{Laser}} = 72,7$  fs hinter dem Laserresonator und  $\Delta t_{\text{Mik}} = 139,6$  fs nach dem Mikroskop. Die Pulslängen sind jeweils größer als das Fourier-Limit. Dies ist auf eine Frequenzmodulation innerhalb des zeitlichen Pulsverlaufs zurückzuführen. Diese Modulation erfährt der Puls durch Gruppengeschwindigkeitsdispersion (engl. *group velocity dispersion*, GVD) innerhalb der Optiken der Strahlengänge. Die durch die GVD verbreiterte Pulsdauer  $\Delta t_{\text{GVD}}$  ergibt sich durch [36]

$$\Delta t_{\text{GVD}} = \Delta t_{\text{TBP}} \sqrt{1 + \left( \frac{4 \cdot \ln 2 \cdot \text{GVD} \cdot z_{\text{opt}}}{\Delta t_{\text{TBP}}^2} \right)^2}. \quad (2.3)$$

Berücksichtigt man alle optischen Komponenten im Strahlengang des Mikroskops und des Interferometers, erhält man eine Gesamtschichtdicke von etwa 5 cm, die von der Laserstrahlung bei der Autokorrelationsmessung nach dem Mikroskop durchlaufen wird. Dadurch wäre gemäß Gleichung (2.3) eine Pulsdauer von  $\Delta t_{\text{GVD}} = 142$  fs nach dem Mikroskop zu erwarten (Für Quarzglas und BK7-Glas typische  $\text{GVD} = 437 \text{ fs}^2/\text{cm}$  [36]). Dieser Wert stimmt gut mit der gemessenen Pulsdauer nach dem Mikroskop  $\Delta t_{\text{Mik}} = 139,6$  fs überein.

## 2.2 Dreidimensionale Fokuspositionierung

Um die Struktur einer Probe mittels eines nichtlinear optischen Mikroskops zu vermessen, ist es nötig Probe und Laserfokus relativ zueinander zu bewegen. Am einfachsten ist dies erreichbar, indem die Probe auf einen dreiachsigen Linearverschiebetisch montiert wird. Diese Methode hat zwei Nachteile: Zum einen ist aufgrund der Masse der Probe und des Linearverschiebetisch der Positioniervorgang träge. Zum anderen wird durch die Bewegung der Probe eine Dynamik in das zu untersuchende System gebracht. Eine solche Dynamik kann das zu untersuchende System stören. Um diese Nachteile zu umgehen, wurde im aufgebauten Mikroskop statt der Probenbewegung eine dreidimensionale Variation der Position des Laserfokus realisiert. Hierzu wird die Laserstrahlung mit zwei rotierbaren Spiegeln abgelenkt und mittels eines Teleskopaufbaus auf das fokussierende Objektiv abgebildet. Die Elemente der Fokuspositionierung werden im Folgenden näher erläutert.

Mittels eines zweidimensionalen Galvo-Scanners (Nutfield Technology, OFH-5) kann der Laserstrahl in den transversalen Achsen abgelenkt werden. Ein zweidimensionaler Galvo-Scanner besteht aus zwei zueinander orthogonalen Spiegeln, welche um ihre Längsachse drehbar gelagert sind. Durch Variation des Stroms durch eine Spule in der Spiegelhalterung wird die Orientierung des Spiegels, welcher an einen Permanentmagneten gekoppelt ist, kontrolliert. Eine schematische Darstellung einer Strahlablenkung in einer Dimension ist in Abbildung 2.5 gezeigt. Aufgrund der Ablenkung verlässt der Strahl die optische Achse. Um die Abweichung von der optischen Achse zu kompensieren, wird ein Teleskop in  $4f$ -Konfiguration verwendet (siehe Abbildung 2.6). Hierbei steht der Galvo-Scanner im Fokus der ersten Teleskoplinse  $L_1$ . Die zweite Teleskoplinse  $L_2$  ist im Abstand der Summe der beiden Brennweiten  $f_1$  und  $f_2$  positioniert. Im Fokus der zweiten

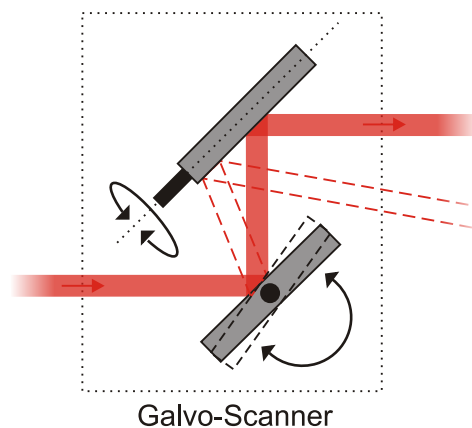


Abbildung 2.5: Eindimensionale Strahlablenkung mit einem Galvo-Scanner. Die Ablenkung in der zweiten Dimension ist nicht dargestellt. Der Laserstrahl wird von links in den Scanner eingekoppelt. Der mit durchgezogenen Linien dargestellte Strahlengang definiert die Ruhelage und die optische Achse. Exemplarisch ist ein abgelenkter Strahl gestrichelt eingezeichnet.

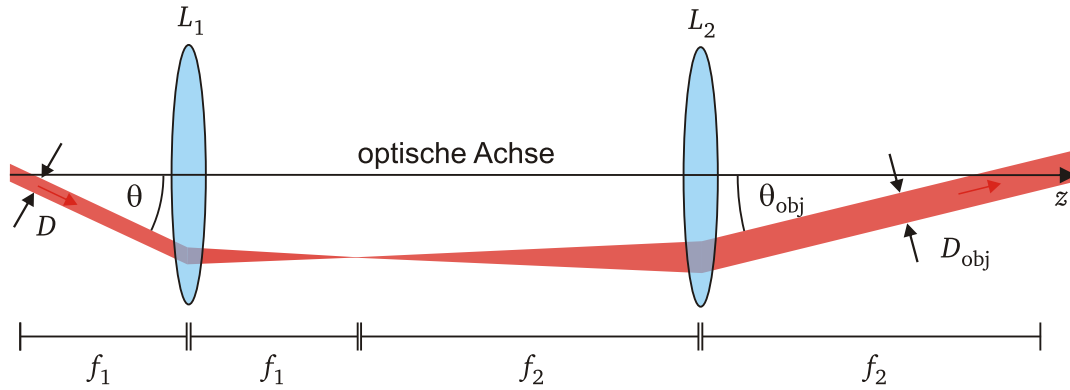


Abbildung 2.6: Teleskop in  $4f$ -Konfiguration. Der von links kommende Laserstrahl mit einem Winkel  $\theta$  zur optischen Achse hat einen Durchmesser  $D$  und wird durch das Teleskop auf die optische Achse abgebildet. Der Laser bleibt auch nach dem Teleskop kollimiert und besitzt eine transversale Ausdehnung von  $D_{\text{obj}}$ .

Teleskoplinse  $L_2$  befindet sich der kollimierte Strahl für alle Ablenkwinkel  $\theta$  auf der optischen Achse. Die Propagationsrichtung des Laserstrahls ändert sich durch das Teleskop von einem Winkel  $\theta$  zu einem Winkel  $\theta_{\text{obj}}$ . Dieser Winkel  $\theta_{\text{obj}}$  ist gegeben durch [28]

$$\theta_{\text{obj}} = -\frac{f_1}{f_2} \theta. \quad (2.4)$$

Zudem ändert sich der Strahldurchmesser von  $D$  zu

$$D_{\text{obj}} = \frac{f_2}{f_1} D. \quad (2.5)$$

Somit wird der vom Galvo-Scanner um den Winkel  $\theta$  abgelenkte Laserstrahl durch das Teleskop auf die optische Achse abgebildet. Für das nichtlinear optische Mikroskop wurden Linsen der Brennweite  $f_1 = 100 \text{ mm}$  und  $f_2 = 300 \text{ mm}$  gewählt. Die beiden Linsen haben eine freie Apertur von  $50,8 \text{ mm}$ , um große Ablenkungen des Galvo-Scanners zu erlauben. Durch die gegebenen Brennweiten wird der Strahl um das Dreifache aufgeweitet. Positioniert man im Brennpunkt hinter der zweiten Teleskoplinse ein Objektiv zur Strahlfokussierung, so führt die Strahlaufweitung zu einer vollen Ausleuchtung dessen freier Apertur. Die volle Ausleuchtung garantiert eine möglichst starke Fokussierung. Durch das Teleskop wird das Objektiv stets zentrisch mit einem Einfallswinkel von  $\theta_{\text{obj}}$  getroffen. Abbildung 2.7 stellt diesen Fall graphisch dar.

Der Winkel  $\theta_{\text{obj}}$  führt zu einem transversalen Versatz  $\delta x$  des Fokus in der Fokalebene. Dieser Versatz berechnet sich zu [22]

$$\delta x = f_{\text{obj}} \arctan \theta_{\text{obj}}, \quad (2.6)$$

wobei  $f_{\text{obj}}$  für die Brennweite des Objektivs steht. Hier wurde nur die Ablenkung in einer Achse beschrieben, kann aber für beide transversale Achsen verallgemeinert

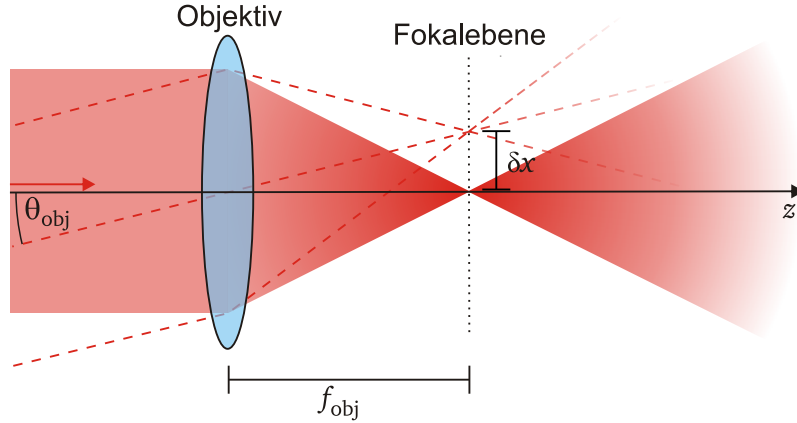


Abbildung 2.7: Der von links unter dem Winkel  $\theta_{obj}$  einfallende Strahl trifft das Objektiv zentrisch. Das Objektiv ist als dünne Linse dargestellt. Der Winkel  $\theta_{obj}$  führt zu einem transversalen Versatz  $\delta x$  des Fokus in der Fokalebene.

werden. Somit ist die Fokusposition in den beiden transversalen Achsen  $x$  und  $y$  kontrollierbar. An dieser Stelle wurde der Effekt der Bildfeldwölbung vernachlässigt. Bei der Bildfeldwölbung wird die Fokalebene aufgrund der vom Einfallswinkel abhängigen Lichtbrechung im Objektiv zu einer gekrümmten Fläche [22, 26]. Um trotz der Bildfeldwölbung eine transversal verlaufende Fläche zu vermessen, muss die Position des Laserfokus entlang der optischen Achse verändert werden. Dies wird durch einen motorisierten Linearverschiebetisch (Zaber Technologies, T-LSM025A), auf dem das Objektiv montiert ist, ermöglicht. Verglichen mit der Brennweite der zweiten Teleskoplinse  $f_2 = 300 \text{ mm}$  sind die typischerweise zu untersuchenden Probenausdehnungen von wenigen  $100 \mu\text{m}$  verschwindend gering. Daher kann die Dejustierung des Systems durch die longitudinale Bewegung des Objektivs vernachlässigt werden.

Mit dem beschriebenen Aufbau ist eine dreidimensionale Positionierung des Fokus innerhalb der Probe möglich, ohne die Probe durch Bewegung verursachte Dynamik zu stören. Bei dem typischerweise verwendeten Objektiv (Zeiss, 46 04 08,  $10\times$  /  $NA_F = 0,22$ ) kann der Fokus in einem Gebiet von  $1300 \mu\text{m} \times 1300 \mu\text{m} \times 3470 \mu\text{m}$  mit minimaler Schrittweite von  $0,066 \mu\text{m} \times 0,066 \mu\text{m} \times 0,048 \mu\text{m}$  bewegt werden. In der transversalen Richtung wird der Bereich durch die Apertur der ersten Teleskoplinse limitiert. Dieser Bereich kann durch eine zusätzliche Verschiebung der Probe erweitert werden. In longitudinaler Richtung ergibt sich die Beschränkung durch den Arbeitsabstand des Objektivs. Verglichen mit der typischen Fokusaussdehnung (transversal gegeben durch die Strahltaile  $w_0$  ( $1/e^2$ -Radius im Beugungslimit mit Brechungsindex  $n = 1$ ) [37]

$$w_0 = \frac{\lambda \sqrt{1 - (NA_F)^2}}{\pi \cdot NA_F} = 1,14 \mu\text{m} \quad (2.7)$$

und longitudinal gegeben durch die Rayleigh-Länge  $\tilde{z} = 5 \mu\text{m}$  gemäß Gleichung (1.23)) sind die minimalen Schrittweiten so fein, dass die Genauigkeit des Systems durch die Ausdehnung des Laserfokus festgelegt wird.



## 2.3 Separation und Detektion harmonischer Frequenzen

Variiert man die Fokusposition in einer heterogenen Probe und überlappt den Fokus mit einer Grenzschicht, führt dies zur Emission von frequenzvervielfachter Strahlung. Die harmonischen Frequenzen können spektral von der fundamentalen Strahlung getrennt werden. Dazu werden dichroitische Spiegel und Interferenzfilter verwendet. Der Aufbau ist in Abbildung 2.8 dargestellt. Hierbei tritt die fokussierte Laserstrahlung von unten in die Probe ein. Das aus der Probe austretende Licht ist divergent und wird von einem Kondensor (Qioptiq, G063011000,  $NA_K = 0,65$ ) kollimiert. Zwei dichroitische Spiegel (HR-TH) reflektieren die Strahlung der dritten Harmonischen und transmittieren die zweite Harmonische sowie die fundamentale Laserstrahlung. Vor der Detektion der dritten Harmonischen in einem Photomultiplier (engl.: *photomultiplier tube*, PMT) (Hamamatsu, R5600-U3) wird die Strahlung zusätzlich durch einen spektral schmalbandigen Interferenzfilter von Untergrundstrahlung bereinigt. Analog dazu wird die Strahlung der zweiten Harmonischen von Untergrund und fundamentaler Strahlung separiert und in einem Photomultiplier (Hamamatsu, R7400U-02) detektiert.

Abbildung 2.8 zeigt den Strahlengang ohne Auslenkung. Wenn der Fokus in transversaler Richtung ausgelenkt wird, entfernt sich auch die Strahlung im Bereich der Separation kontinuierlich von der optischen Achse. Daher werden die Abstände der optischen Elemente klein gehalten. Die Gesamtweglänge vom Kondensor zum PMT beträgt 21 cm. Zudem führt an den Orten der Detektion die Fokussierung der Linsen  $L_3$  und  $L_4$  zu einer Abbildung der Strahlung auf die optische Achse. Dadurch wird auch bei maximaler Ablenkung die Strahlung vollständig detektiert. Dies ist zur Aufnahme von quantitativ auswertbaren Bildern notwendig.

Hinter dem herausnehmbaren Strahlblockierer SB befindet sich eine Leuchtdiode (LED). Bei ausgeschaltetem Laser dient diese LED als Lichtquelle für ein konventionelles Lichtmikroskop, welches in den Aufbau integriert ist (siehe Abbildung 2.9). Dieses Lichtmikroskop dient zur Orientierung in der Probe. Das Emissionsspektrum der LED mit Zentralwellenlänge von 620 nm liegt im Transmissionsbereich der verwandten dichroitischen Spiegel. Somit beeinflussen die dichroitischen Spiegel die Abbildung im Lichtmikroskop nicht. Abbildung 2.9 zeigt eine Prinzipskizze des Aufbaus. Das von der LED emittierte Licht gelangt durch den Kondensor in die Probe. Exemplarisch sind in Abbildung 2.9 die Strahlengänge für zwei Strahlenbündel eingezeichnet. Die Strahlenbündel werden durch den Kondensor an unterschiedlichen Positionen in der Fokalebene fokussiert und durch das Objektiv wieder kollimiert. Die parallelen Strahlenbündel werden mit einer Linse auf einen Kamerachip abgebildet. Durch partielle Absorption bzw. Streuung in der Probe kommt es auf dem Kamerachip zu einem bildgebenden Kontrast. Somit erzeugt dieser integrierte Aufbau eine vergrößerte Darstellung der Probe. Abbildung 2.10 belegt die korrekte Funktion des Durchlichtmikroskops. Sie zeigt die Aufnahme einer Kreuzung von mikrofluidischen Kanälen, wie sie in Kapitel 4 näher diskutiert werden.



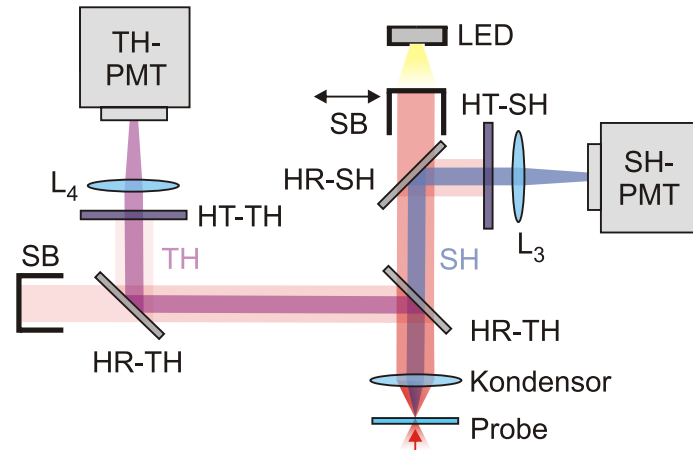


Abbildung 2.8: Aufbau der Separation und Detektion der zweiten und dritten Harmonischen. Folgende Abkürzungen wurden zur Bezeichnung der Optiken verwendet : HR-TH ( $R(270\text{ nm}) = 99,9\%$ ,  $T(405\text{ nm}) > 90\%$  und  $T(810\text{ nm}) > 90\%$ ), HR-SH ( $R(405\text{ nm}) > 90\%$  und  $T(810\text{ nm}) > 90\%$ ), HT-TH ( $T(270\text{ nm}) \approx 30\%$ ,  $T(405\text{ nm}) < 0,001\%$ ,  $T(810\text{ nm}) < 0,001\%$ ), HT-SH ( $T(405\text{ nm}) \approx 60\%$ ,  $T(810\text{ nm}) < 0,001\%$ ), SB (Strahlblockierer),  $L_3$  und  $L_4$  (1"-Linsen mit Brennweiten von 40 mm), SH-PMT und TH-PMT (Photomultiplier für die zweite und dritte Harmonische) und LED (Seoul, X42182).

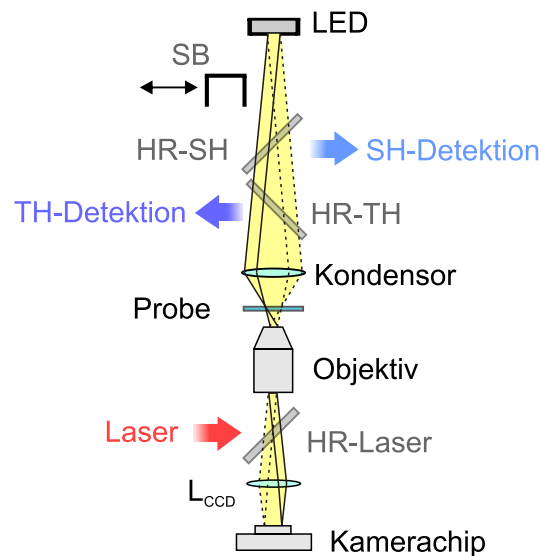


Abbildung 2.9: Aufbau des integrierten Lichtmikroskops. Der mit durchgezogenen Linien dargestellte Strahlengang und der mit gestrichelten Linien dargestellte Strahlengang zeigen zwei Strahlbündel der LED, die in die Probe fokussiert werden. Diese Punkte werden über das Objektiv und die Linse  $L_{CCD}$  (Brennweite = 70 mm) auf einen Kamerachip abgebildet und erzeugen eine vergrößerte Darstellung der Probe.

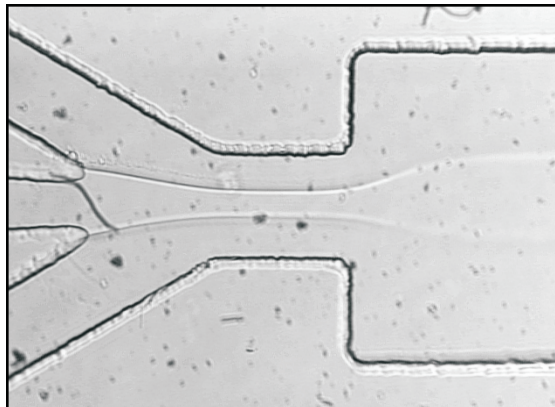


Abbildung 2.10: Aufnahme von mikrofluidischen Kanälen mittels eines Durchlichtmikroskops. Die Aufnahme zeigt die Kreuzung von drei mikrofluidischen Kanälen. Die von links kommenden Einlasskanäle führen in den beiden äußeren Kanälen Wasser und im inneren Isopropanol. Das Flüssigkeitsgemisch fließt nach rechts durch einen Auslasskanal ab. Die Breite des Auslasskanals ist  $400\text{ }\mu\text{m}$ . Die Abmessung des abgebildeten Ausschnitts beträgt etwa  $710\text{ }\mu\text{m} \times 510\text{ }\mu\text{m}$ . Aufgrund des Mischvorgangs sind die Phasengrenzen nach rechts hin immer schlechter erkennbar. Die dunklen Flecken sind auf Verunreinigungen des Kamerschips bzw. der Probe zurückzuführen.

## 2.4 Gesamtaufbau im Überblick

Abbildung 2.11 zeigt den Gesamtaufbau des Mikroskops. Zusätzlich zu den bisher diskutierten Elementen ist eine Strahldiagnostik direkt nach dem Titan:Saphir-Laser dargestellt. Hierbei handelt es sich um einen Laserspektrum-Analysator (Heraeus Noblelight, E201) und um ein Laserleistungsmessgerät (Newport, 407A), die einen Teil der Laserstrahlung zur Kontrolle des Lasersystems verwenden. Zudem wird ein Lock-in-Verstärker (Scitec Instruments, 450DV2) zur Steigerung des Signal-Rausch-Verhältnisses benutzt. Die Laserstrahlung wird durch einen Chopper (Scitec Instruments, 310CD) mit einer Frequenz von bis zu 120 kHz moduliert. Ein Computer nimmt gemessene Intensitäten der zweiten und dritten Harmonischen in Abhängigkeit der Fokusposition auf.

## 2.5 Charakterisierung des nichtlinear optischen Mikroskops

Dieser Abschnitt zeigt die experimentelle Überprüfung der Grenzflächenselektivität mittels des nichtlinearen Mikroskops. Durch spektrale Charakterisierung und Untersuchung der Abhängigkeit der Signalstärke von der Laserleistung wird nachgewiesen, dass es sich bei der detektierten Strahlung um die zweite bzw. dritte Harmonische handelt.

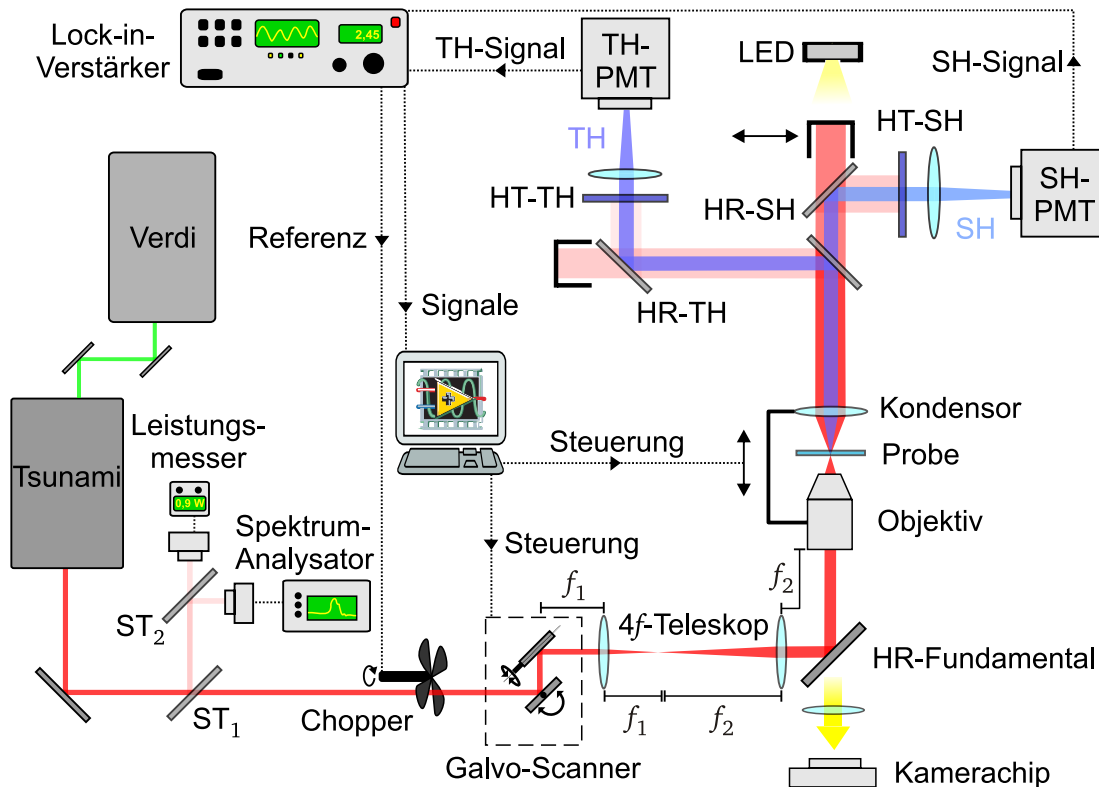
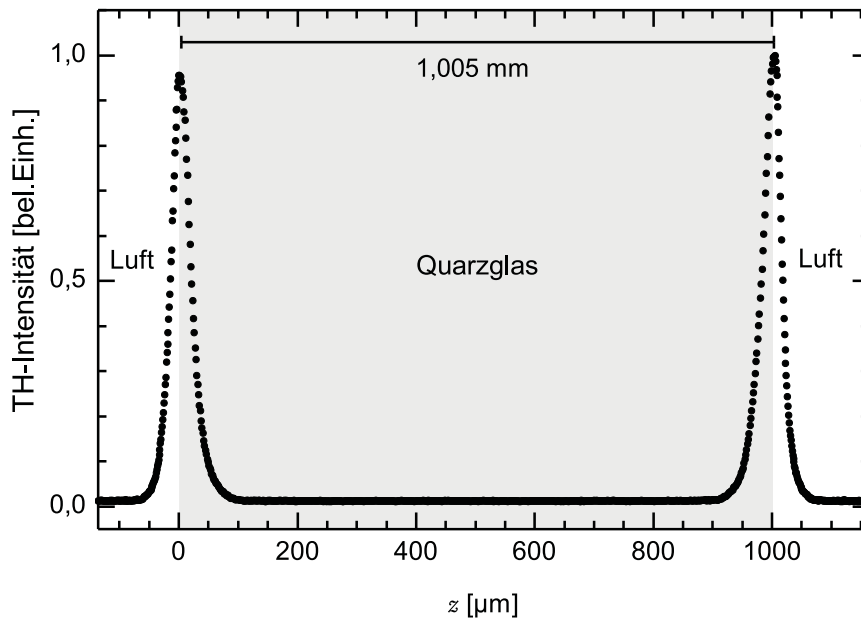


Abbildung 2.11: Aufbau des nichtlinear optischen Mikroskops. Hierbei bezeichnen  $ST_1$  ( $R(810\text{nm}) \approx 20\%$  und  $T(810\text{nm}) \approx 80\%$ ) und  $ST_2$  ( $ST_2 R(810\text{nm}) \approx 50\%$  und  $T(810\text{nm}) \approx 50\%$ ) dielektrische Strahlteiler sowie HR-Fundamental ( $R(810\text{nm}) \geq 97\%$ ) einen dielektrischen Spiegel. Alle weiteren Elemente sind in den jeweiligen Detail-Abbildungen 2.5 bis 2.9 aufgeführt.

### 2.5.1 Frequenzverdreifung

Zunächst wird die Untersuchung des Kanals der dritten harmonischen Frequenz diskutiert. Dazu wurde im Experiment der Fokus entlang der optischen Achse durch eine 1 mm dicke Quarzglasplatte bewegt. Die dabei gemessene, relative Intensität der dritten Harmonischen ist in Abbildung 2.12 aufgetragen.

In dieser Abbildung erkennt man zwei ausgeprägte Maxima bei  $z = 0\text{ }\mu\text{m}$  und bei  $z = 1005\text{ }\mu\text{m}$ . Die dritte Harmonische tritt nur an den Grenzflächen zwischen zwei Medien auf. Dies spiegeln die beiden Maxima der Ober- und Unterseite der Quarzglasplatte wider. Die Amplituden der Maxima sind nahezu identisch, der geringe Unterschied ist auf Absorption und Streuung in der Probe sowie auf Reflexion an der Oberseite der Quarzglasplatte zurückzuführen. Das Signal-Rausch-Verhältnis berechnet sich aus der Amplitude der Signalmaxima und der maximalen Rauschamplitude des Untergrunds zu etwa 400:1. Der Abstand der beiden Maxima passt mit 1,005 mm zur Probenstärke von 1 mm. Hierbei wurde der Unterschied zwischen geometrischer Weglänge  $z_{\text{obj}}$  und optischer Weglänge  $z$  berücksichtigt (siehe Abbildung 2.13).



Abbildungung 2.12: Gemessene, relative Intensität der TH aufgetragen gegen die Fokusposition entlang der  $z$ -Achse. Der Fokus wurde hierbei durch eine Quarzglasplatte bewegt. Die  $z$ -Achse ist durch die optische Achse des Systems definiert. Die Laserstrahlung wurde mit einem Objektiv zehnfacher Vergrößerung und einer numerischen Apertur von  $NA_F = 0,22$  fokussiert. Die Datenpunkte wurden mit einer Schrittweite von einem Mikrometer in Luft aufgenommen. Die Unsicherheit bei der Fokuspositionierung ist geringer als die Ausdehnung der Datenpunkte..

Hierbei gilt die trigonometrische Beziehung

$$z_{\text{obj}} \tan \alpha = d = z \tan \beta . \quad (2.8)$$

Dies lässt sich mit dem Brechungsgesetz von Snell [22] umformen zu

$$z = z_{\text{obj}} \frac{\tan \alpha}{\tan \beta} = z_{\text{obj}} \frac{\tan \alpha}{\tan[\arcsin(n_L/n_Q \sin \alpha)]} . \quad (2.9)$$

In der Kleinwinkelnäherung, welche für moderat brechende Objektive (hier:  $NA_F = 0,22$ ) gerechtfertigt ist, vereinfacht sich dieser Ausdruck zu

$$z = z_{\text{obj}} \frac{n_Q}{n_L} . \quad (2.10)$$

Diese Beziehung wurde in Abbildung 2.12 bereits berücksichtigt. Dadurch beträgt der Abstand zwischen zwei Messpunkten in Luft  $1 \mu\text{m}$  und in Quarzglas  $1,45 \mu\text{m}$ . Hierbei wurden die Brechungsindizes in Luft mit  $n_L \approx 1$  und in Quarzglas mit  $n_Q \approx 1,45$  angenommen [38, 39].

Abbildungung 2.14 zeigt eine detailliertere Darstellung des Maximums an der Unterseite der Quarzglasplatte. Zudem ist eine angepasste Lorentz-Kurve dargestellt.

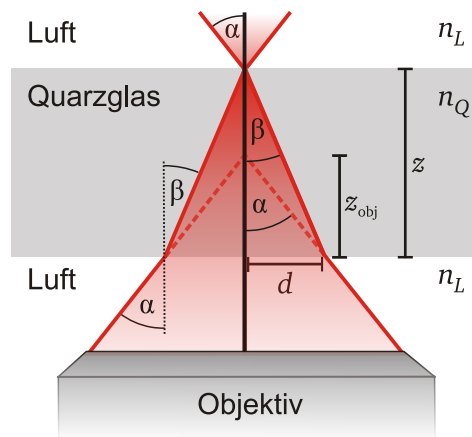


Abbildung 2.13: Berechnung der optischen Weglänge  $z$  aus der geometrischen Weglänge  $z_{\text{obj}}$  bei der Laserfokussierung in Quarzglas. Hierbei bezeichnen  $n_L$  und  $n_Q$  die Brechungsindizes in Luft und Quarzglas. Der maximale Einfallswinkel  $\alpha$  ist durch die numerische Apertur  $NA_F$  gemäß  $\alpha = \arcsin(NA_F/n_L)$  gegeben. Daraus resultiert aufgrund der Brechung an der Probenoberfläche der kleinere Winkel  $\beta$ .  $d$  beschreibt den Strahlradius am Ort der Grenzfläche.

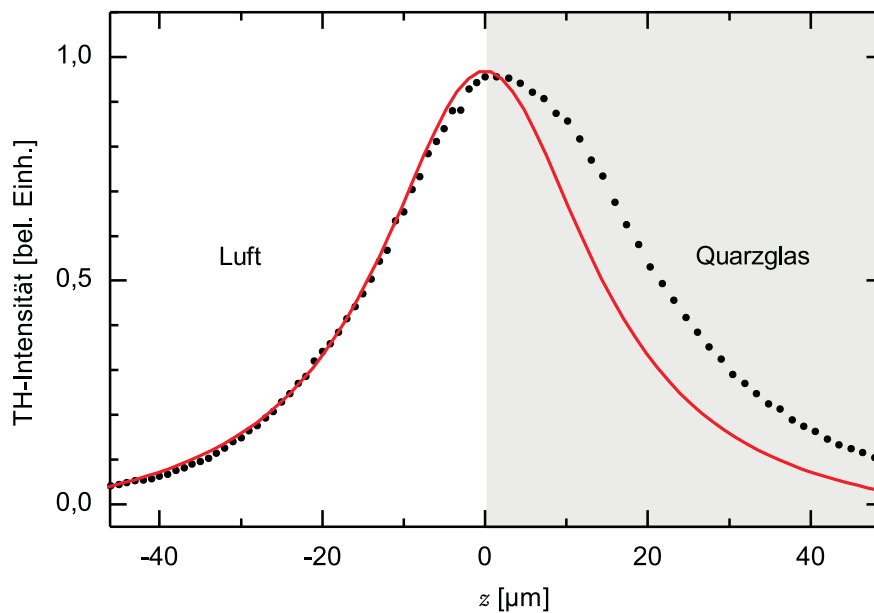


Abbildung 2.14: Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung 2.12. An einem Übergang von Luft nach Quarzglas gemessene, relative Intensität der dritten Harmonischen (schwarze Punkte) aufgetragen gegen die Fokusposition entlang der  $z$ -Achse. Die rote Kurve zeigt eine angepasste Lorentz-Funktion an die Messdaten in Luft. Die Unsicherheit in der Ordinate wird durch Abweichungen zum theoretischen Verlauf zu weniger als 5% abgeschätzt.

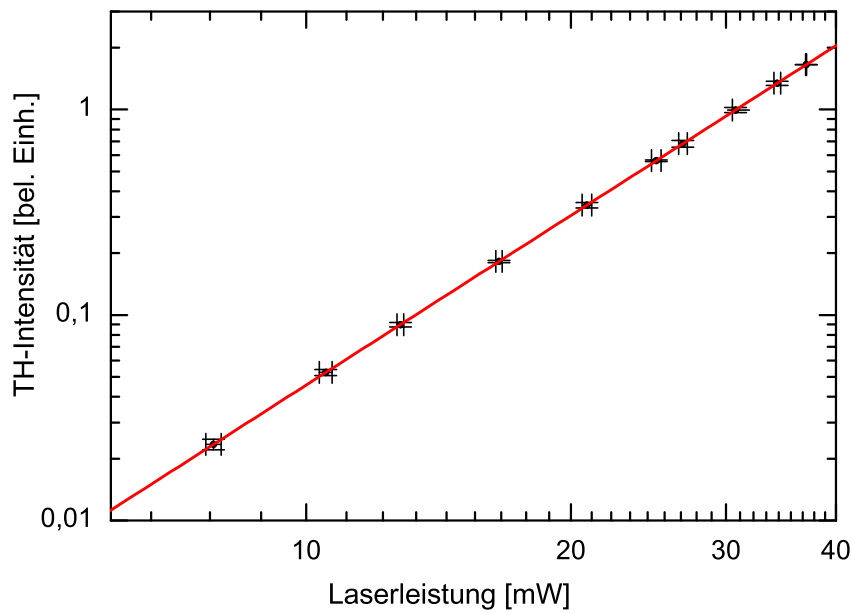


Abbildung 2.15: Doppelt-logarithmische Auftragung der gemessenen, relativen Intensität der dritten Harmonischen (TH) gegen die eingestrahlte, mittlere Laserleistung. Die Messwerte der Intensität der dritten Harmonischen sind als schwarze Punkte samt Fehlerbalken eingetragen. Die rote Kurve stellt eine Anpassung der Funktion  $ax^q + b$  an die Datenpunkte dar. Die Anpassung liefert eine Potenz von  $q = 2,74 \pm 0,13$ .

Die Anpassung erfolgte nur an die Messwerte in Luft. Die Lorentz-Kurve wurde hier verwendet, da diese nach Gleichung (1.21) das longitudinale Profil eines Gauß-Strahls beschreibt. Aus der Anpassung und einem Korrekturfaktor von 1,96 (aufgrund der Potenzierung der Intensität bei der THG) lässt sich die Rayleigh-Länge in Luft zu  $\tilde{z} = 17,7 \mu\text{m} \cdot 1,96 = 34,7 \mu\text{m}$  bestimmen. Da die Rayleigh-Länge reziprok proportional zur Wellenlänge  $\lambda_Q$  ist und diese ebenfalls reziprok proportional zum Brechungsindex  $n_Q$  ist, gilt für die Rayleigh-Länge in Quarzglas

$$\tilde{z}_Q = \frac{\pi w_0^2}{\lambda_Q} = \frac{\pi w_0^2 n_Q}{\lambda} = n_Q \tilde{z} \quad (2.11)$$

Eine Lorentz-Kurvenanpassung an die Messwerte in Quarzglas mit dem Korrekturfaktor ergibt  $\tilde{z}_Q = 24,5 \mu\text{m} \cdot 1,96 = 47,9 \mu\text{m}$ . Das Verhältnis der beiden ermittelten Rayleigh-Längen liegt mit 1,39 nahe an dem zu erwartenden Verhältnis von  $n_Q/n_L \approx 1,45$ .

Zur Verifizierung, dass es sich bei der detektierten Strahlung um frequenzverdreites Licht handelt, wird dessen Intensitätsabhängigkeit von der eingestrahnten, mittleren Laserleistung untersucht. Hierzu wurde die Strahlung auf eine Quarzglas-Luft-Grenzschicht fokussiert und die Laserleistung mit einem variablen Abschwächer modifiziert. Die Datenpunkte dieser Messung sind in Abbildung 2.15 in doppelt-logarithmischer Auftragung dargestellt. Die in den Grundlagen hergeleitete Beziehung (1.33) zeigt eine Intensitätsabhängigkeit der dritten Harmonischen (TH) zur dritten Potenz der fundamentalen Laserleistung. An die Messwerte

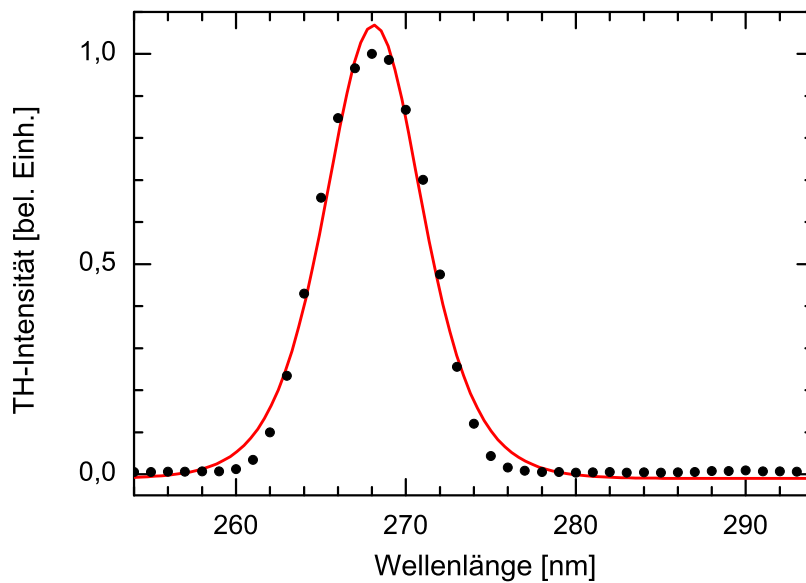


Abbildung 2.16: Gemessenes Spektrum der im Kanal der dritten Harmonischen detektierten Strahlung. Die Messwerte sind als schwarze Punkte dargestellt. Die rote Kurve zeigt eine an die Messwerte angepasste quadratische Sekans-Hyperbolicus-Funktion. Der verwendete Gitter-Spektrometer, der die Wellenlängen selektiert, ist ein Eigenbau und hat eine absolute Unsicherheit von wenigen Nanometern [40].

wurde eine Funktion der Form  $ax^q + b$  angepasst. Die Anpassung liefert einen Wert  $q = 2,74 \pm 0,13$ , welcher leicht unterhalb der theoretischen Erwartung von  $q = 3$  liegt. Da in den Grundlagen dämpfende Effekte wie Brechung, Reflexion, Streuung, Absorption nicht berücksichtigt wurden, bestätigt der Wert  $q = 2,74 \pm 0,13$  die Abhängigkeit zur dritten Potenz hinreichend gut. Somit handelt es sich um einen nichtlinearen Effekt dritter Ordnung. Um auszuschließen, dass es sich bei der detektierten Strahlung um andere Effekte dritter Ordnung wie Selbstphasenmodulation, kreuzpolarisierte Wellenerzeugung, Drei-Photonen angeregte Fluoreszenz, nichtlineare Streuprozesse oder Selbstfokussierung handelt, zeigt Abbildung 2.16 das Spektrum der detektierten Strahlung. Das Spektrum weist ein Maximum bei 268,1 nm mit einer Halbwertsbreite von 7,2 nm auf. Die geringe Abweichung zum erwarteten Wert von  $810/3 \text{ nm} = 270 \text{ nm}$  sowie der erwarteten Halbwertsbreite von  $15,4 \text{ nm}/3 = 5,1 \text{ nm}$  ist auf die Auflösung  $\Delta\lambda = 2 \text{ nm}$  des verwendeten Eigenbau-Spektrometers zurückzuführen [40].

Zusammenfassend identifizieren das gemessene Spektrum und die gezeigte Intensitätsabhängigkeit die detektierte Strahlung eindeutig als die dritte Harmonische der fokussierten Laserstrahlung. Auch die erwartete Grenzflächenselektivität wurde durch die Messungen bestätigt.

Die Konversionseffizienz der Frequenzverdreifung lässt sich aus dem Verhältnis der Pulsenergie der dritten Harmonischen zur Pulsenergie der Laserstrahlung berechnen. In einer typischen Messung wird eine mittlere Laserleistung von 200 mW fokussiert. Dies führt bei einer Repetitionsrate von 82 MHz zu einer Pulsenergie von 2,5 nJ. Die gemessene TH-Leistung lässt sich über die Verstärkung des Lock-

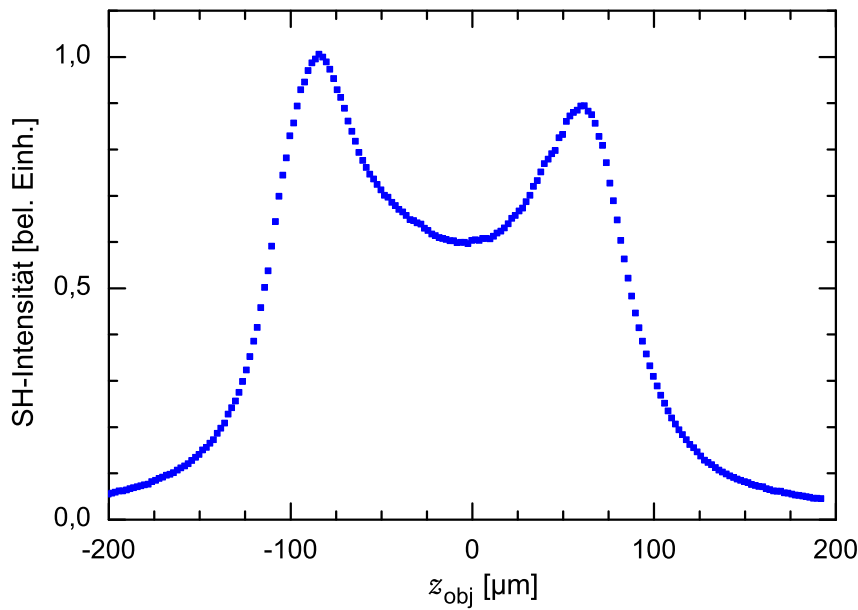


Abbildung 2.17: An einem Beta-Bariumborat-Kristall gemessene, relative Intensität der zweiten Harmonischen (SH) aufgetragen gegen die geometrische Weglänge  $z_{\text{obj}}$  entlang der  $z$ -Achse. Die Messpunkte wurden in einem Abstand von jeweils zwei Mikrometer zueinander aufgenommen. Die Laserstrahlung wurde mit einem Objektiv zehnfacher Vergrößerung und einer numerischen Apertur von  $NA_F = 0,22$  fokussiert.

In-Verstärkers, die Verstärkung des PMT, der Repetitionsrate des Lasers, die Transmission des Interferenzfilters und der Quantenausbeute des PMT zu etwa 12000 erzeugten Photonen der dritten Harmonischen pro Einzelpuls (TH-Pulsenergie  $\approx 9 \text{ fJ}$ ) abschätzen. Die Konversionseffizienz liegt damit in der Größenordnung  $10^{-6}$ .

## 2.5.2 Frequenzverdopplung

Die Charakterisierung des Detektionskanals der zweiten Harmonischen erfolgt analog zum oben dargestellten Verfahren für die dritte Harmonische. In zentrosymmetrischen Medien wie Quarzglas findet keine Frequenzverdopplung statt. Daher wird zur Charakterisierung ein  $300 \mu\text{m}$  dicker Beta-Bariumborat-Kristall (BBO) als Medium verwendet. Die Orientierung des Kristalls wurde so gewählt, dass keine Phasenanpassung erfüllt ist. Daher entsteht die frequenzverdoppelte Strahlung ausreichend effizient nur an den Grenzflächen des Mediums. Um dies zu verifizieren, wurde der Laserfokus entlang der optischen Achse durch den Kristall bewegt. Abbildung 2.17 zeigt die dabei im Detektionskanal der frequenzverdoppelten Strahlung gemessene, relative Intensität aufgetragen gegen die geometrische Weglänge des Objektivs  $z_{\text{obj}}$ . Wie im vorangegangenen Abschnitt sind auch hier zwei Maxima von Probenunter- und Probenoberseite erkennbar. Die maximale Intensität der beiden Maxima unterscheidet sich um etwa zehn Prozent. Dies ist durch Absorption und Streuung in der Probe sowie Reflexion an



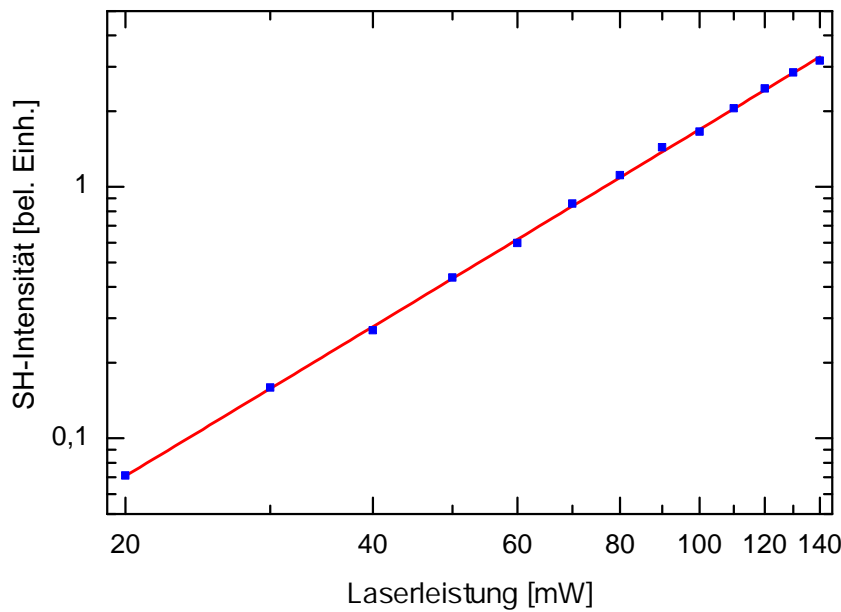


Abbildung 2.18: Doppelt-logarithmische Auftragung der gemessenen, relativen Intensität der zweiten Harmonischen (SH) gegen die eingestrahlte, mittlere Laserleistung. Die Messwerte sind als blaue Quadrate eingetragen. Die rote Kurve stellt eine Anpassung der Funktion  $ax^q + b$  an die Datenpunkte dar. Die Anpassung liefert eine Potenz von  $q = 1,86 \pm 0,05$

der Oberseite zu erklären. Die Halbwertsbreite der Maxima ist mit  $64\mu\text{m}$  etwa um einen Faktor 3,6 breiter als jene der dritten Harmonischen. Dies ist nahe dem Verbreiterungsfaktor von 3,4, der sich aus Simulationen ergibt [28]. Die Maxima liegen so nahe beieinander, dass die gemessene Intensität zwischen den beiden Maximalwerten nicht auf null zurückgeht. Aufgrund ihrer schmalen Maxima ist die dritte Harmonische besser geeignet, um die Struktur einer Probe wiederzugeben.

Zum Nachweis, dass es sich bei der detektierten Strahlung um die Frequenzverdoppelte handelt, wurde die Laserleistungsabhängigkeit des Signals sowie dessen Spektrum untersucht. Abbildung 2.18 zeigt in einer doppelt-logarithmischen Darstellung das detektierte Signal aufgetragen gegen die Laserleistung. An die Datenpunkte in Abbildung 2.18 wird eine Kurve der Form  $ax^q + b$  angepasst. Die Anpassung ergibt eine Potenz von  $q = 1,86 \pm 0,05$ . Dies liegt leicht unter dem theoretisch erwarteten Wert von  $q = 2$ . Da die Theorie keinerlei Verluste berücksichtigt wie Brechung, Reflexion, Streuung und Absorption, ist eine solche Verminderung des experimentellen Werts zu erwarten. In Abbildung 2.19 ist das Spektrum der detektierten Strahlung dargestellt. An die Datenpunkte wurde eine quadratische Sekans-Hyperbolicus-Funktion angepasst. Das zentrale Maximum liegt demnach bei  $406,1\text{nm}$  bei einer Halbwertsbreite von  $9,7\text{nm}$ . Der erwartete Wert für die Zentralwellenlänge ist  $810/2\text{nm} = 405\text{nm}$  und die erwartete Halbwertsbreite beträgt  $15,4\text{nm}/2 = 7,7\text{nm}$ . Die geringe Abweichung der experimentell ermittelten Werte ist durch die Auflösung  $\Delta\lambda = 2\text{nm}$  des verwendeten Eigenbau-Spektrometers bedingt [40]. Somit belegen sowohl das Spektrum als

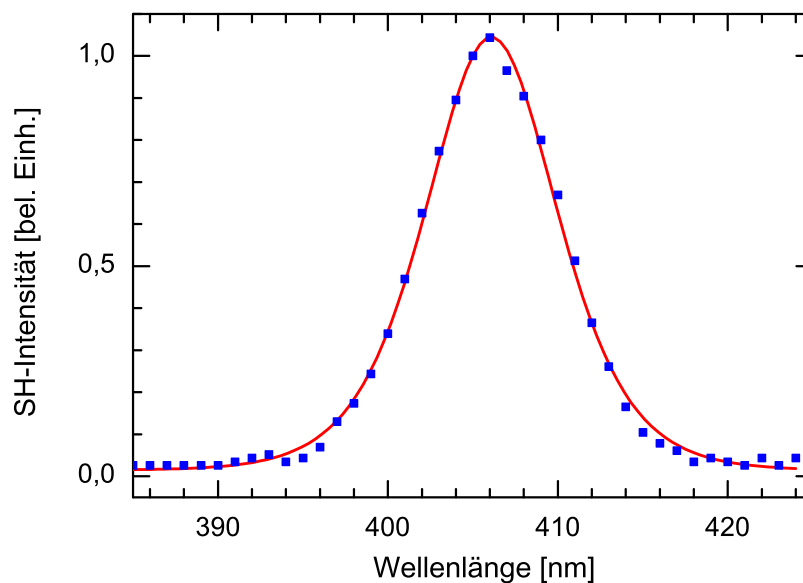


Abbildung 2.19: Gemessenes Spektrum der im Kanal der zweiten Harmonischen detektierten Strahlung. Die Messwerte sind als blaue Quadrate dargestellt. Die rote Kurve zeigt eine an die Messwerte angepasste, quadratische Sekans-Hyperbolicus-Funktion.

auch die Intensitätsabhängigkeit, dass es sich bei der detektierten Strahlung des Kanals der zweiten Harmonischen um die frequenzverdoppelte Strahlung handelt. Der Informationsgewinn durch Detektion der zweiten Harmonischen wird häufig verwendet um nicht-zentrosymmetrische Probenbestandteile zu identifizieren. In biologischen Proben können so beispielsweise Bereiche mit Kollagen nachgewiesen werden [7, 41–44]. Die zusätzliche Information wird in einer abschließenden parallelen Überprüfung der beiden Detektionskanäle der SH und TH einer heterogenen Probe demonstriert. Die Probe besteht aus einem Quarzglas- und einem BBO-Körper, welche auf einem Glasobjektträger liegen. Abbildung 2.20 (links) und (rechts) zeigen zwei  $xy$ -Schnitte durch die Probe. Bei dem linken Bild handelt es sich um eine Falschfarbendarstellung der gemessenen, relativen Intensität der dritten Harmonischen, bei dem rechten um jene der simultan dazu gemessenen, relativen Intensität der zweiten Harmonischen. Der Fokus wurde hierbei über die Oberseite des Objektträgers bewegt. Die Messungen bestehen aus 10000 Datenpunkten. Die Integrationszeit des Lock-In-Verstärkers je Bildpunkt lag bei 2 ms. Je nach Signal-Rausch-Verhältnis wird die Integrationszeit typischerweise zwischen 1 ms und 10 ms variiert. Die Integrationszeit kann auf bis zu  $1\ \mu\text{s}$  reduziert werden, allerdings ist bei diesen geringen Integrationsdauern kein gutes Signal-Rausch-Verhältnis erreichbar. In der Darstellung der dritten Harmonischen sind vier Bereiche erkennbar. Da die Oberseite des Objektträgers eine Grenzfläche darstellt, wird an allen Fokuspositionen frequenzverdreifachte Strahlung erzeugt. Aufgrund von Reflexion und Brechung wird das Signal unterhalb von vertikalen Kanten der Körper „abgeschattet“. Im rechten Bild der zweiten Harmonischen ist hingegen nur in dem Bereich des BBO ein hohes Signal erkennbar. Somit muss

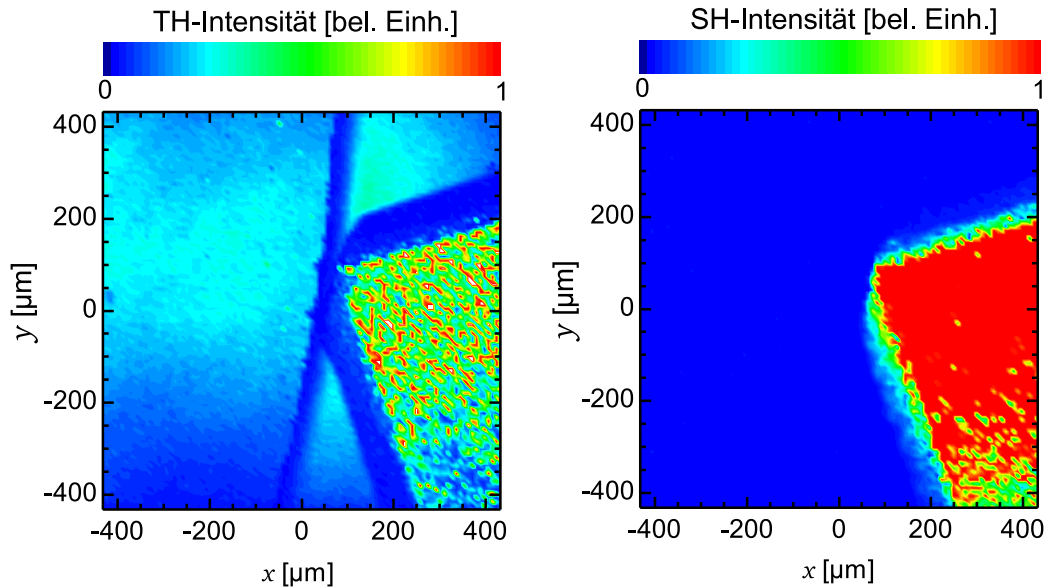


Abbildung 2.20: Falschfarbendarstellung der gemessenen, relativen Intensität der dritten Harmonischen (TH) (links) und zweiten Harmonischen (SH) (rechts) in einem  $xy$ -Schnitt der Quarzglas-BBO-Glas-Probe. Beide Aufnahmen bestehen aus 10000 äquidistanten Bildpunkten, die innerhalb von 45 Sekunden gemessen wurden. Parameter der Messung: Objektiv ( $10\times$  /  $NA_F = 0,22$ ), Chopperfrequenz (50 kHz), mittlere Laserleistung (1 W), PMT-Spannung (THG: 0,55 kV, SHG: 0,3 kV), Lock-In-Einstellungen (Eingangsverstärkung (THG: 20, SHG: 20), Ausgangsverstärkung (THG: 200, SHG: 500), Integrationszeit (2 ms), Zeitkonstante ( $500\ \mu\text{s}$ ), Filter-Ordnung (1)).

sich der Quarzglaskörper im linken Bereich der Aufnahme befinden. Der Kanal der zweiten Harmonischen ermöglicht einen weiteren Informationsgewinn und die Zuordnung der Bereiche.

Zusammenfassend wurde das im Rahmen dieser Arbeit entstandene nichtlinear optische Mikroskop im Detail vorgestellt. Hierbei wurde die im Mikroskop eingesetzte Laserstrahlung charakterisiert. Das Mikroskop zeichnet sich durch einen in drei Dimensionen frei positionierbaren Laserfokus und durch ein in den Strahlengang integriertes Lichtmikroskop aus. Sowohl die zweite als auch die dritte Harmonische werden im Mikroskop detektiert. Hierbei konnte die Grenzflächenselektivität der Frequenzkonversionsprozesse erfolgreich nachgewiesen und charakterisiert werden.

## Kapitel 3

### Untersuchung des emittierten Intensitätsprofils

Die THM wird bereits seit mehr als zehn Jahren erfolgreich vor allem in biologischen Proben angewandt [5–9]. Unterstützend zur THM wird häufig auch die SHM benutzt, um nicht-zentrosymmetrische Bereiche mikroskopisch abzubilden und zu identifizieren [7, 45, 46]. Als prominentes Beispiel seien die Arbeiten von Olivier et al. zur dreidimensionalen Beobachtung von Zellteilungszyklen in Zebrafischembryos genannt. Diese Untersuchungen wurden durchgeführt ohne das sensible System durch Farbstoffe oder Energieeinträge zu stören [7]. Hierbei wurde die Struktur der Probe – Zellmembranen, Zellkerne, etc. – durch die THM abgebildet. Die SHM zeigt eine starke Abhängigkeit vom jeweiligen Prozess der Mitose und erreicht ihr Maximum in der Telophase (der Zellkernteilung). Damit dient die SHM hier als Maß für die Kinetik der Zellteilung.

Auch in vielen weiteren Forschungsfeldern wie der Chemie [10, 11], der Materialwissenschaft [12, 13] oder der Bioanalyse [3, 41] hat vor allem die THM zahlreiche Anwendungen gefunden. Umso überraschender ist, dass viele Details der THM und SHM noch nicht untersucht bzw. verstanden sind. In einigen wissenschaftlichen Publikationen konnten keine Grenzflächen, die parallel zur optischen Achse verlaufen, detektiert werden [47–49]. Allerdings sagen die numerischen Simulationen von Cheng et al. und Olivier et al. die Emission von frequenzverdreifachter Strahlung auch an parallel zur optischen Achse ausgerichteten Grenzflächen vorher [21, 50]. Die beiden Simulationen widersprechen sich jedoch bezüglich des Vorzeichens der Intensitätsänderung. Ferner zeigen Olivier et al. zweidimensionale Abstrahlcharakteristika für parallel und orthogonal zur optischen Achse verlaufende Grenzflächen. Diese Simulationen wurden bisher weder experimentell bestätigt noch widerlegt. Dabei ist die Abstrahlcharakteristik unter anderem für die Wahl eines geeigneten Kondensors ausreichend großer numerischer Apertur zur Kollimation der frequenzkonvertierten Strahlung von entscheidender Bedeutung.

Zudem ist der Einfluss der Grenzflächenorientierung bezüglich der Laserpolarisation ebenfalls nicht vollständig geklärt. Oron et al. zeigten, dass in isotropen Medien bei zirkular polarisierter Fundamentalstrahlung keine messbare Frequenzverdreifachung stattfindet [51]. Weiter stellten Schwartz et al. fest, dass die Polarisierung der frequenzkonvertierten Strahlung linear und parallel zur linearen Polarisierung der Fundamentalstrahlung ist [52]. Die Orientierung der linearen Polarisierung des eingestrahnten Lasers hat bei Grenzflächen orthogonal zur Laserpropagationsrichtung keinen Einfluss auf die Effizienz der Frequenzkonversion [53]. In numerischen Berechnungen wurde für Grenzflächen parallel zur optischen Achse ein deutlicher Einfluss der Grenzflächenorientierung zur linearen Laserpolarisa-

tion vorhergesagt [50]. Diese Berechnungen wurden bisher nicht experimentell verifiziert.

Die diskutierten Abhängigkeiten und Einflüsse auf die Frequenzkonversion sind für die korrekte Interpretation und Optimierung von SHM- und THM-Aufnahmen relevant. Daher werden die systematische Untersuchung und Charakterisierung der relevanten Abstrahlungs-Eigenschaften der SHM und THM in den folgenden Abschnitten vorgestellt. Die Untersuchungen werden an einer zylindrischen Probe durchgeführt, welche sich aufgrund ihrer Rotationssymmetrie für systematische Untersuchungen besonders gut eignet. Dieses Kapitel ist in drei Abschnitte unterteilt. Im ersten Abschnitt wird die Probe vorgestellt und die Abbildung mittels der SHM und THM gezeigt. Der darauf folgende Abschnitt beschäftigt sich mit Messungen bei der Orientierung der Probensymmetrieachse orthogonal zur optischen Achse. Diese Konfiguration erlaubt eine systematische Variation der Neigungen der Manteloberfläche und ermöglicht so eine systematische Untersuchung dessen Einfluss auf die Frequenzverdopplung bzw. -verdreifachung. Der letzte Abschnitt handelt von Messungen der THM und SHM an der parallel zur Strahlachse ausgerichteten Probe. Damit variiert der Schnittwinkel zwischen der Laserpolarisation und der Manteloberfläche kontinuierlich, sodass dessen Einfluss auf die SHM bzw. THM studiert werden kann.<sup>1</sup>

## 3.1 Dreidimensionale Vermessung der Probe

Bei den im Folgenden vorgestellten Experimenten wird eine Quarzglaskapillare (Qsil, DA1.8DI0.15) als Probe verwendet. Die Kapillare weist einen Außendurchmesser von 1,8mm und einen Innendurchmesser von 0,2mm auf (siehe Abbildung 3.3). Zur Vermeidung störender Effekte durch Brechung und Reflexion wird die Kapillare an allen Grenzflächen von einem Immersionsöl mit angepassten Brechungsindex (Cargille, 50350) umgeben. Diese vollständig transparente, heterogene Probe mit homogenem Brechungsindex kann durch Methoden der linearen Mikroskopie nicht abgebildet werden. Abbildung 3.1 zeigt Fotografien der Kapillare, welche sich in einem Bad aus Wasser (unten), darauf schwimmenden Immersionsöl (mitte) und darüber liegender Luft (oben) befindet. Während im Wasser noch die Konturen der Kapillare sichtbar sind, verschwindet die Kontur im Bereich des Immersionsöls. Auf dem linken Foto befindet sich Luft in der Kapillare, sodass der innere Hohlraum aufgrund der stattfindenden Brechung erkennbar ist. Im rechten Bild ist (wie auch in den folgenden Messungen) der Innenraum mit Immersionsöl gefüllt, sodass die Kapillare komplett verschwindet.

Wird der Laserfokus in allen drei Raumrichtungen durch die Probe bewegt und die dabei emittierte Leistung der zweiten bzw. dritten Harmonischen detektiert, so erhält man eine dreidimensionale Rekonstruktion der Probenstruktur. Eine solche Rekonstruktion ist für die Messung der Frequenzverdoppelten in Abbildung 3.2 (links) und für die Frequenzverdreifachte in Abbildung 3.2 (rechts) dargestellt. Hierbei wurden benachbarte Orte mit Messwerten oberhalb einer gewählten

---

<sup>1</sup>Teile der Ergebnisse dieses Kapitels sind im Rahmen der Masterarbeit von Christian Wenski entstanden, welche vom Autor mit betreut wurde [54].



Abbildung 3.1: Fotografien der in einen Messzylinder (Wasser, Immersionsöl, Luft) eingetauchten Quarzglas kapillare. (links) Kapillare mit Luft gefüllt. (rechts) Kapillare mit Immersionsöl gefüllt.

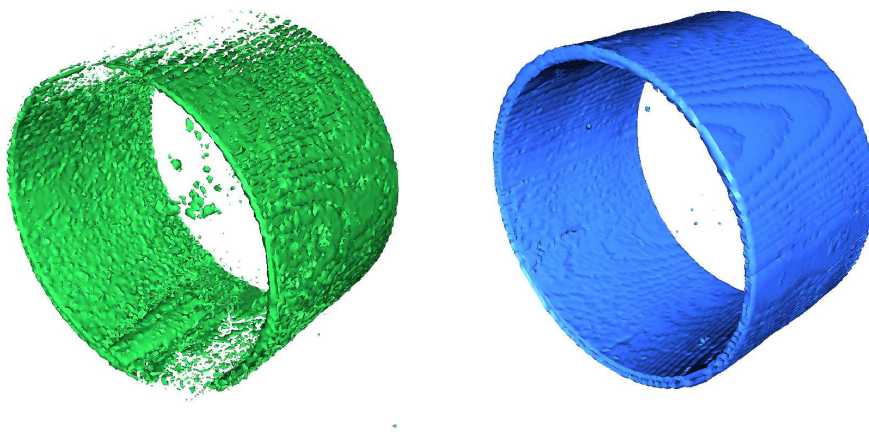


Abbildung 3.2: Abbildung der Kapillare im Immersionsöl mittels SHM und THM. Vermessung der Grenzfläche zwischen dem Immersionsöl innen und der Quarzglas kapillare außen. Die Visualisierung der SHM-Messwerte (links) und der THM-Messwerte (rechts). Die Messungen bestehen aus jeweils  $125 \times 125 \times 65$  Messwerten. Der gemessene Bereich hat eine Ausdehnung von jeweils  $250 \mu\text{m} \times 250 \mu\text{m} \times 130 \mu\text{m}$ . Die Symmetrieachse der Kapillare ist entlang der  $z$ -Achse orientiert, die Polarisation des Lasers entlang der  $x$ -Achse. Die Punkte innerhalb der Kapillaren sind auf Schwebstoffe zurückzuführen. Parameter der Messung: Objektiv ( $10\times$  /  $NA_F = 0,22$ ), Chopperfrequenz (50 kHz), mittlere Laserleistung (1 W), PMT-Spannung (THG: 0,35 kV, SHG: 0,6 kV), Lock-In-Einstellungen (Eingangsverstärkung (THG: 20, SHG: 20), Ausgangsverstärkung (THG: 150, SHG: 650), Integrationszeit (4 ms), Zeitkonstante ( $500 \mu\text{s}$ ), Filter-Ordnung (1)).

Schwelle miteinander verbunden. Dies wurde mit einem Algorithmus zur Visualisierung von Kernspintomographieaufnahmen durchgeführt (ImageJ, 3D-Viewer). Die Messung erfolgte über den zentralen Bereich der Kapillare und zeigt den mit Immersionsöl gefüllten Kapillarinnenraum. In beiden Abbildungen 3.2 (links) und (rechts) erkennt man daher klar die Grenzfläche zwischen dem Quarzglas (außen) und dem Immersionsöl (innen). Das Signal-Rausch-Verhältnis ist in der THM-Aufnahme gegenüber der SHM-Aufnahme deutlich erhöht. Aus den gemessenen Signalen ergibt sich, dass etwa 250-mal mehr Photonen der dritten Harmonischen erzeugt werden als Photonen der zweiten Harmonischen. Grund dafür ist, dass es sich bei Quarzglas und dem Immersionsöl prinzipiell um zentrosymmetrische Medien handelt und somit die nichtlineare Suszeptibilität zweiter Ordnung verschwindet (siehe Abschnitt 1.1). Daher findet im Allgemeinen keine Frequenzverdopplung statt. Da das amorphe Quarzglas innerhalb kleiner Bereiche eine Nahfeldordnung aufweist, kann eine schwache Frequenzverdopplung gemessen werden [55]. Die beiden Abbildungen demonstrieren durch die scharfe dreidimensionale Darstellung der transparenten Probe mit homogenem Brechungsindex das Potential der nichtlinear optischen Mikroskopie.

## 3.2 Abhängigkeit der Frequenzkonversion von der Oberflächenneigung

### 3.2.1 Intensität und räumliche Auflösung der Frequenzkonversion

In diesem Abschnitt werden Messungen vorgestellt, die den Einfluss der Grenzflächenneigung bezüglich der optischen Achse auf die Intensität und die räumliche Auflösung in der SHM und THM systematisch untersuchen. Abbildung 3.3 zeigt die gewählte Geometrie der Messungen. Die Symmetrieachse der Kapillare ist entlang der  $y$ -Achse ausgerichtet. Die Propagationsrichtung des Lichts verläuft kollinear zur  $z$ -Achse.

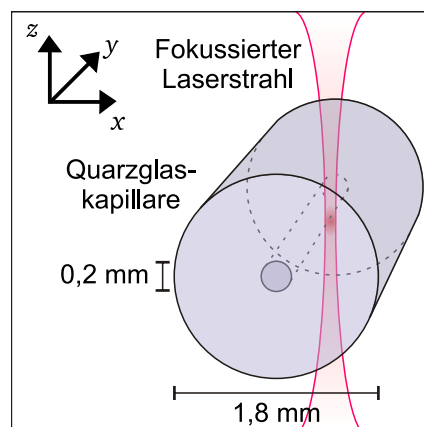


Abbildung 3.3: Geometrie und Orientierung der Messung zum Einfluss der Grenzflächenneigung auf die Frequenzkonversion.



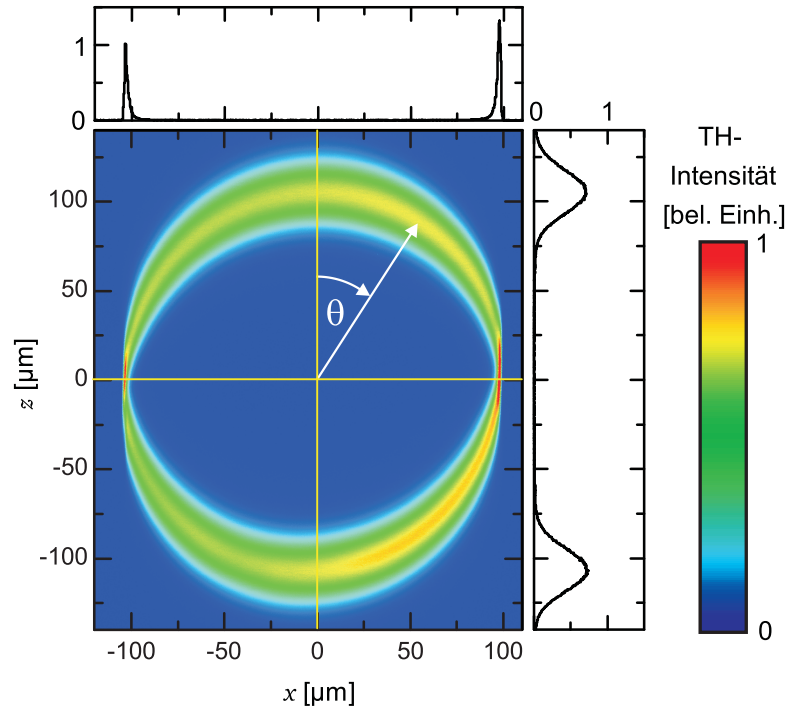


Abbildung 3.4: THM-Aufnahme eines lateralen Schnitts in der  $xz$ -Ebene durch die Kapillare in Falschfarbendarstellung. Die Symmetrieachse der Kapillare ist hierbei entlang der  $y$ -Achse orientiert. Die Aufnahme besteht aus  $920 \times 1026$  Messwerten. Rechts und oberhalb des Graphen sind exemplarisch Schnitte entlang der horizontalen bzw. vertikalen gelben Linie dargestellt. Die geringe Asymmetrie der Signalamplitude entlang der  $x$ -Achse ist typisch für eine Aufnahme mit einem Galvo-Scanner, stört aber die Diskussion der Daten nicht. Parameter der Messung: Objektiv ( $10\times / NA_F = 0,22$ ), Chopperfrequenz (50 kHz), mittlere Laserleistung (1 W), THG-PMT-Spannung (0,35 kV), Lock-In-Einstellungen (Eingangsverstärkung (20), Ausgangsverstärkung (150), Integrationszeit (4 ms), Zeitkonstante ( $500 \mu\text{s}$ ), Filter-Ordnung (1)).

Abbildung 3.4 zeigt einen  $xz$ -Querschnitt der THM-Aufnahme in Falschfarbendarstellung. Die Grenzfläche zwischen dem Immersionsöl innen und dem Quarzglas außen hebt sich vom blauen Untergrund deutlich ab. Die verschiedenen Grenzflächenneigungen werden durch den Winkel  $\theta$  zwischen der optischen Achse und der Normalen der Grenzfläche beschrieben. Die Halbwertsbreite der Intensität entlang der Oberflächennormalen nimmt dabei mit wachsendem Winkel  $\theta$  von  $28 \mu\text{m}$  für transversal verlaufende Grenzflächen zu  $2 \mu\text{m}$  für longitudinal verlaufende Grenzflächen monoton ab. Gleichzeitig nimmt die maximale Intensität kontinuierlich zu. Die Maximalintensität bei  $\theta = \pi/2$  steigt hierbei gegenüber der Maximalintensität bei  $\theta = 0$  um einen Faktor von 1,9 an. Eine analoge Beschreibung gilt für die SHM-Aufnahme in Abbildung 3.5, welche sich aufgrund des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses für kleine Winkel  $\theta$  nicht vom Untergrund abhebt.

Die beobachteten Effekte sind auf die Form des Laserfokus zurückzuführen. Dieser weist eine in longitudinaler Richtung größere Ausdehnung auf als in den symmetrischen, transversalen Achsen (Zigarrenform). Zur Analyse der räumlichen Auf-



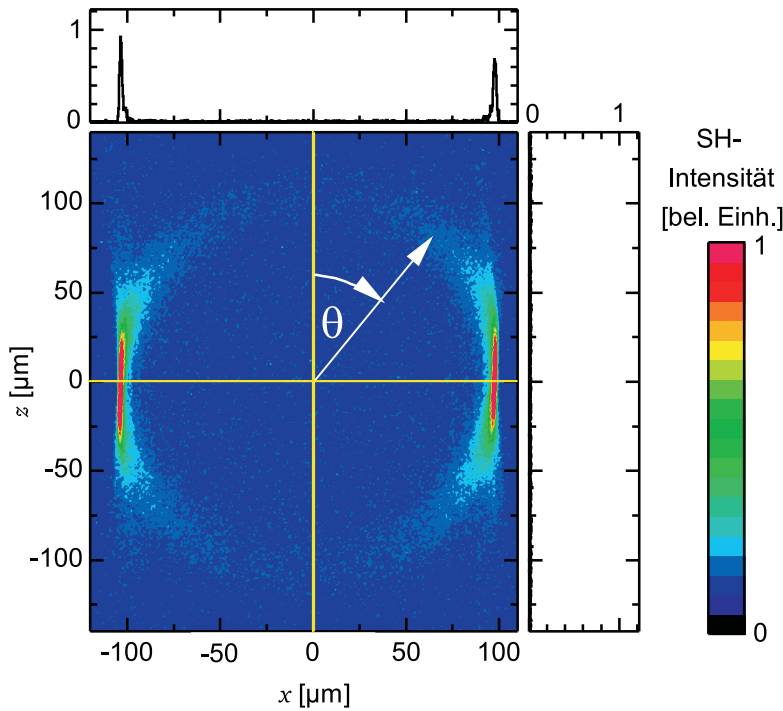


Abbildung 3.5: SHM-Aufnahme eines lateralen Schnitts in der  $xz$ -Ebene durch die Kapillare in Falschfarbendarstellung. Die Symmetrieachse der Kapillare ist hierbei entlang der  $y$ -Achse orientiert. Die Aufnahme besteht aus  $920 \times 1026$  Messwerten. Rechts und oberhalb des Graphen sind exemplarisch Schnitte entlang der horizontalen bzw. vertikalen gelben Linie dargestellt. Parameter der Messung: Objektiv ( $10\times / NA_F = 0,22$ ), Chopperfrequenz (50 kHz), mittlere Laserleistung (1 W), SHG-PMT-Spannung (0,7 kV), Lock-In-Einstellungen (Eingangsverstärkung (20), Ausgangsverstärkung (650), Integrationszeit (4 ms), Zeitkonstante (500  $\mu$ s), Filter-Ordnung (1)).

lösung ist in Abbildung 3.6 (links) die Halbwertsbreite (FWHM) der radialen TH-Intensitätsverläufe gegen den Winkel  $\theta$  aufgetragen. Die Halbwertsbreite wurde jeweils über die Anpassung einer Gauß-Kurve an den Intensitätsverlauf eines radialen Schnitts ermittelt. Neben den Messwerten wurde die Funktion [56]

$$\tilde{d}(\theta) = 2\sqrt{a^2 + (1 - \cos^2 \theta)b^2} \quad (3.1)$$

mit der kleinen Halbachse  $a = \frac{2\mu\text{m}}{2}$  und der großen Halbachse  $b = \frac{28\mu\text{m}}{2}$  in den Graph eingezeichnet. Diese Funktion beschreibt die Schnittlänge  $\tilde{d}(\theta)$  einer Ellipse mit einer Gerade mit dem Winkel  $\theta$  zur optischen Achse (siehe Abbildung 3.6 (rechts)). Da die Kurve der Funktion  $\tilde{d}(\theta)$  gut mit der Messung übereinstimmt, unterstützt dies die Annahme eines typischen, zigarrenförmigen Fokusvolumens. Die beobachtete erhöhte Maximalintensität für longitudinale Grenzflächen ergibt sich durch einen größeren räumlichen Überlapp von Grenzfläche und dem zigarrenförmigen Fokusvolumen und der damit einhergehenden größeren Anzahl emittierender Moleküle [57].

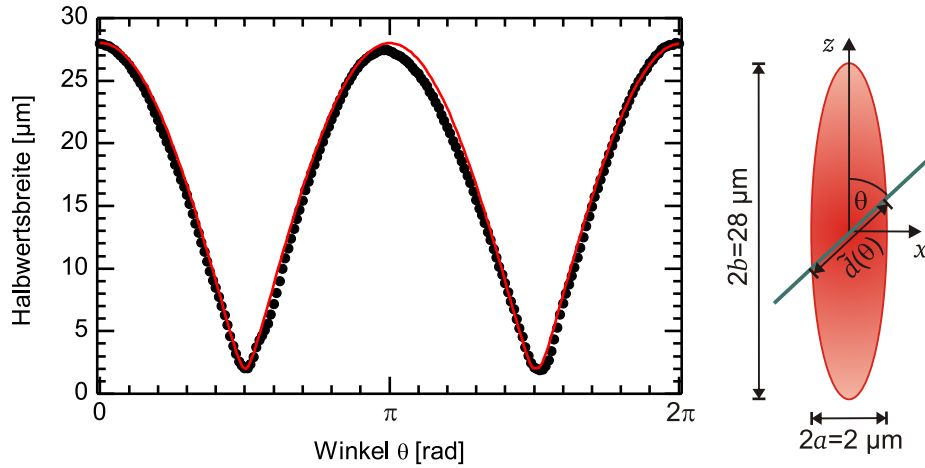


Abbildung 3.6: (links) Halbwertsbreite (schwarze Punkte) der radialen TH-Intensitätsverläufe aus Abbildung 3.4 gegen den Winkel  $\theta$  aufgetragen. Die rote Kurve zeigt die Schnittlänge  $\tilde{d}(\theta)$  mit einer Ellipse der Halbachsen  $a = \frac{2\mu\text{m}}{2}$  und  $b = \frac{28\mu\text{m}}{2}$  nach Gleichung (3.1). (rechts) Schematische Darstellung der Schnittlänge  $\tilde{d}(\theta)$  einer Ellipse mit einer Gerade mit dem Winkel  $\theta$  zur optischen Achse.

Die Fokusaushendung und deren Einfluss lassen sich auch an einer weiteren Messung demonstrieren. Hier wurden sphärische Silikatpartikel (Micromod Partikeltechnologie, sicastar 43-00-202) mit einem Durchmesser von 200 nm auf einer Glasoberfläche vermessen. Abbildung 3.7 zeigt die dreidimensionale Rekonstruktion der Probe. In Blau sind die Daten der THM dargestellt und in Grün die der SHM. Der blaue Quader spiegelt die Objektträgeroberfläche im Messbereich wider. Die grüne zigarrenförmige Struktur ist auf die Nanopartikel zurückzuführen. Wie bereits in Kapitel 2 beschrieben, ist die axiale Auflösung in der THM besser als in der SHM. Da die Nanopartikel im Gegensatz zum Quarzglas ein hohes Signal in der SHM zeigen und mit 200 nm deutlich kleiner sind als die Fokusaushendung, dient der dreidimensionale SHM-Intensitätsverlauf als Maß für das Fokusvolumen. Auch hier zeigt sich die deutlich die Verbreiterung des Signalverlaufs in longitudinaler Richtung. Berücksichtigt man die Änderung des Lorentz- und Gauß-Profiles durch die Nichtlinearität der Prozesse, so lässt sich auf die transversale und longitudinale Ausdehnung des fundamentalen Laserfokus schließen. Die grün gepunktete Linie in Abbildung 3.8 zeigt die mit den experimentell bestimmten Werten der SHM-Aufnahme der Nanopartikel gemäß Gleichung (1.22) berechnete Ausdehnung des fokussierten Lasers. Die blau gestrichelte Kurve wurde aus den Werten der THM-Messung an der Quarzglaskapillare ermittelt. Zum Vergleich wurde das Beugungslimit gemäß [37]

$$w_0 = \frac{\lambda \sqrt{1 - (NA_F/n)^2}}{\pi NA_F/n} \quad (3.2)$$

aus der numerischen Apertur  $NA_F$  der Fokussierung und dem Brechungsindex  $n$  berechnet. Der damit theoretisch zu erwartende Verlauf der Strahlausdehnung mit

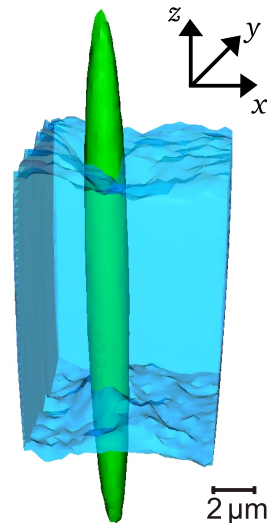


Abbildung 3.7: Dreidimensionale Rekonstruktion der SHM- und THM-Daten von Nanopartikeln auf einem Objektträger. Benachbarte Orte mit Messwerten oberhalb einer gewählten Schwelle wurden durch einen Algorithmus zur Visualisierung von Kernspintomographieaufnahmen verbunden. Die SHM-Messwerte sind in Grün und die THM-Messwerte in Blau dargestellt. Die Messungen bestehen aus jeweils  $100 \times 100 \times 30$  Messwerten. Der gemessene Bereich hat eine Ausdehnung von jeweils  $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m} \times 60 \mu\text{m}$ . Parameter der Messung: Objektiv ( $10 / NA_F = 0,22$ ), Chopperfrequenz ( $20 \text{ kHz}$ ), mittlere Laserleistung ( $1 \text{ W}$ ), PMT-Spannung (THG:  $0,5 \text{ kV}$ , SHG:  $0,6 \text{ kV}$ ), Lock-In-Einstellungen (Eingangsverstärkung (THG: 20, SHG: 20), Ausgangsverstärkung (THG: 150, SHG: 650), Integrationszeit ( $4 \text{ ms}$ ), Zeitkonstante ( $500 \mu\text{s}$ ), Filter-Ordnung (1)).

den Gleichungen (1.23) und (1.22) bestimmt (rote Kurve in Abbildung 3.8). Zudem wurde die reale Ausdehnung des fokussierten Lasers mit der Knife-Edge Methode vermessen. Hierbei wird eine Metallklinge an vielen longitudinalen Positionen transversal durch den fokussierten Laserstrahl bewegt. Aus dem während der Bewegung detektierten Leistungsverlauf hinter der Klinge lässt sich der jeweilige Strahldurchmesser bestimmen. Ein Vergleich der Graphen in Abbildung 3.8 zeigt, dass die Messungen der Knife-Edge Methode gut mit dem theoretischen Verlauf übereinstimmen. Lediglich im Bereich des Fokus werden größere Ausdehnungen gegenüber dem Beugungslimit gemessen. Diese Diskrepanz ist aufgrund verschiedener Abbildungsfehler (chromatisch, sphärisch, etc.) des Objektivs zu erwarten. Die Verläufe der aus den Messungen der SHM und THM liegen ebenfalls in der zu erwartenden Größenordnung. Die gegenüber den anderen beiden Verläufen geringere Divergenz ist durch den wesentlich größeren Brechungsindex des umgebenden Mediums bedingt. Insgesamt kann die reale, räumliche Ausdehnung des Laserfokus im jeweiligen Medium leicht aus den Daten der SHM (Nanopartikel auf Objektträger: transversale FWHM  $2 \mu\text{m}$ ) und der THM (Quarzglaskapillare in Immersionsöl: transversale FWHM  $3,4 \mu\text{m}$ ) abgeschätzt werden (siehe Abbildung 3.8).

Während die räumliche Auflösung der THM sich ähnlich verhält wie in den Simulationen von Cheng et al. beschrieben, ist die Frequenzkonversion an parallel zur

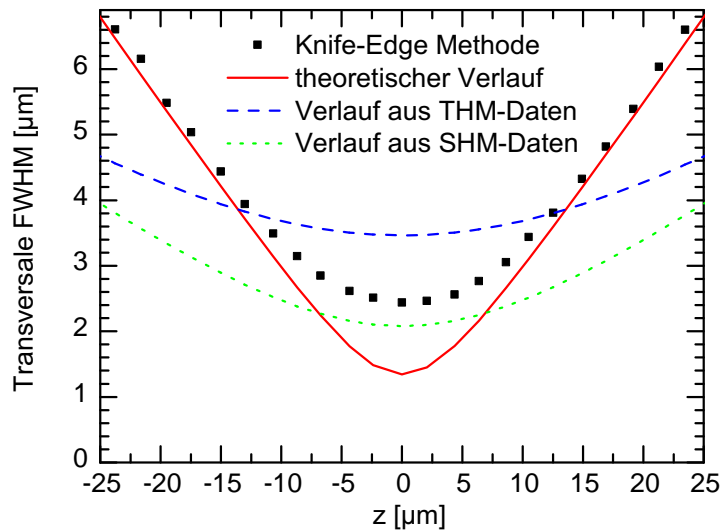


Abbildung 3.8: Transversale Ausdehnung des fundamentalen Laserfokus entlang der optischen Achse. Sowohl die Daten der Knife-Edge Methode als auch die des theoretischen Verlaufs gelten für Luft als umgebendes Medium ( $n = 1$ ). Parameter der Knife-Edge Messung: Objektiv ( $10\times$  /  $NA_F = 0,22$ ), mittlere Laserleistung ( $0,1$  W), Photodiode (Thorlabs, SM05PD1A), Stromverstärker (Femto, DLCPA-200, Verstärkung: 10000), Schrittweite (transversal:  $0,017\ \mu\text{m}$ , longitudinal:  $2\ \mu\text{m}$ ).

optischen Achse verlaufenden Grenzschichten stärker als an Grenzschichten orthogonal dazu. Ein Grund für diese Diskrepanz könnte an der stärkeren Fokussierung in der Simulation liegen. Cheng et al. verwendeten eine numerische Apertur von  $NA_F = 1,4$ . Aufgrund dieser stärkeren Fokussierung ist die Elliptizität des Fokusbereichs weniger stark ausgeprägt. Verglichen mit dem Experiment ist dadurch der räumliche Überlapp des Fokusbereichs mit einer longitudinal verlaufenden Grenzfläche und damit die Frequenzkonversion geringer.

Die räumliche Auflösung der THM im vorliegenden Experiment ist für longitudinal verlaufende Grenzschichten etwa 14-mal höher als für transversal verlaufende Grenzflächen. Zudem ist die dabei emittierte Leistung der frequenzkonvertierten Strahlung nahezu doppelt so intensiv.

### 3.2.2 Untersuchung der Abstrahlcharakteristik in der THM

In diesem Abschnitt wird die Untersuchung der Abstrahlcharakteristik der frequenzverdreifachten Strahlung vorgestellt. Schins et al. untersuchten experimentell das Emissionsprofil der THM senkrecht zur optischen Achse für transversal verlaufende Grenzflächen [58]. Hierbei beobachteten sie ein zentrales Emissionsmaximum, welches gegenüber dem fundamentalen Lichtfeld eine verkleinerte Ausdehnung aufweist. Die Simulationen von Cheng et al. und Olivier et al. sagen für die Emission von frequenzverdreifachter Strahlung an Grenzflächen, die parallel zur optischen Achse verlaufen, zwei abseits der optischen Achse liegende Maxima vorher [21, 50]. Diese Simulationen wurden bisher nicht experimentell

verifiziert. Darüber hinaus sind keine Informationen über die Abstrahlcharakteristik der THM bei Grenzflächenneigungen jenseits dieser beiden Extremfälle in der Literatur zu finden. Dies ist ein wichtiger Aspekt für die vorgeschlagene, multifokale THM [3, 59–62]. Hierbei soll die Messdauer durch Verwendung mehrerer, gleichzeitiger, räumlich separierter Laserfokusse und einen ortsauflösenden Detektor reduziert werden. Die in den Simulationen vorhergesagten nicht-zentrischen Maxima der frequenzverdreifachten Strahlung könnten hier zu einem Übersprechen der in verschiedenen Fokusse erzeugten Photonen auf einem ortsauflösenden Detektor führen. Zudem gilt bisher die empirisch gefundene Regel, dass die numerische Apertur der Linse zur Detektion um einen Faktor drei kleiner sein kann als die der Fokussierung [58]. Bei Maxima abseits der optischen Achse, wie Cheng et al. und Olivier et al. prognostizieren, könnte diese Regel ungültig sein [21, 50]. Um hier zu belastbaren Aussagen zu kommen, wurde die Abstrahlcharakteristik systematisch untersucht.

Zur Vermessung der Abstrahlcharakteristik der THM wurde eine in  $x$  und  $y$  bewegliche Lochblende in einem Abstand von 5 mm über dem Kondensor in den Detektionsstrahlengang gebracht. Die Lochblende hat einen Durchmesser von  $400\text{ }\mu\text{m}$ . Dieser Durchmesser stellt einen Kompromiss zwischen der mit dem Durchmesser quadratisch wachsenden Signalstärke und der sich dadurch verringernden Auflösung dar. Der  $1/e^2$ -Laserstrahldurchmesser hinter dem Kondensor beträgt durch Strahlaufweitung und Divergenz etwa 3,5 mm. Dem intuitiven Ansatz der Frequenzverdreifachung folgend (siehe Kapitel 1.3.1) ist eine Verringerung der transversalen Ausdehnung der dritten Harmonischen gegenüber der fundamentalen Strahlung um einen Faktor  $1/\sqrt{3}$  zu erwarten ( $\rightarrow 1/e^2$ -TH-Durchmesser  $\approx 2\text{ mm}$ ) [17, 58]. Gemäß dem Nyquist-Shannon-Abtasttheorem wird die Lochblende um ihren halben Durchmesser in  $200\text{ }\mu\text{m}$ -Schritten über die freie Apertur des Kondensors bewegt und tastet punktweise das Emissionsprofil der frequenzverdreifachten Strahlung ab [26, 63]. Mit etwa 80 Messwerten innerhalb des zu erwarteten zweidimensionalen Maximums ist bei dieser Schrittweite eine ausreichende Anzahl an Stützstellen zur Profilcharakterisierung vorhanden. Abbildung 3.9 stellt den zur Messung der Abstrahlcharakteristik modifizierten Aufbau schematisch dar. Die Lochblende wird von zwei Schrittmotoren mit einer absoluten Genauigkeit im Sub-Mikrometerbereich bewegt. Durch ihre Abmessung von 2" bedeckt die Lochblende auch bei einer maximalen Auslenkung von 1" den Kondensor vollständig.

Zunächst wird das Emissionsprofil einer transversal verlaufenden Grenzfläche untersucht. Dazu dient der Glas-Luft-Übergang an einem Objektträger. Abbildung 3.10 zeigt die gemessene, relative Intensität der fundamentalen Laserstrahlung (links) und der frequenzverdreifachten Strahlung (rechts) aufgetragen gegen die Position der Lochblende. Wie zu erwarten, erhält man jeweils näherungsweise eine zweidimensionale Gauß-Verteilungen. Die mittleren  $1/e^2$ -Durchmesser ergeben sich bei der fundamentalen Strahlung zu 3,6 mm und bei der frequenzverdreifachten Strahlung zu 2 mm. Das Verhältnis dieser Durchmesser liegt mit  $0,55 \approx 1/\sqrt{3}$ , 2 nahe an dem theoretisch erwarteten Wert von  $1/\sqrt{3}$  [17, 58]. Die Elliptizität der Maxima ist auf das ebenfalls elliptische Strahlprofil des Lasers zurückzuführen. Das Aspektverhältnis des Lasers beträgt 1 : 1,33 (siehe Abschnitt 2.1). Für Abbil-

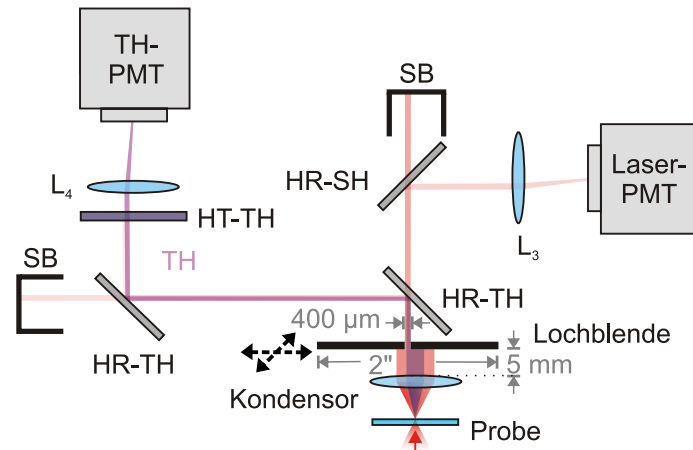


Abbildung 3.9: Aufbau zur Messung der Abstrahlcharakteristik der dritten Harmonischen. Hierbei wird eine  $400\text{ }\mu\text{m}$ -Lochblende in  $200\text{ }\mu\text{m}$ -Schritten automatisiert von Schrittmotoren über den Kondensor bewegt.

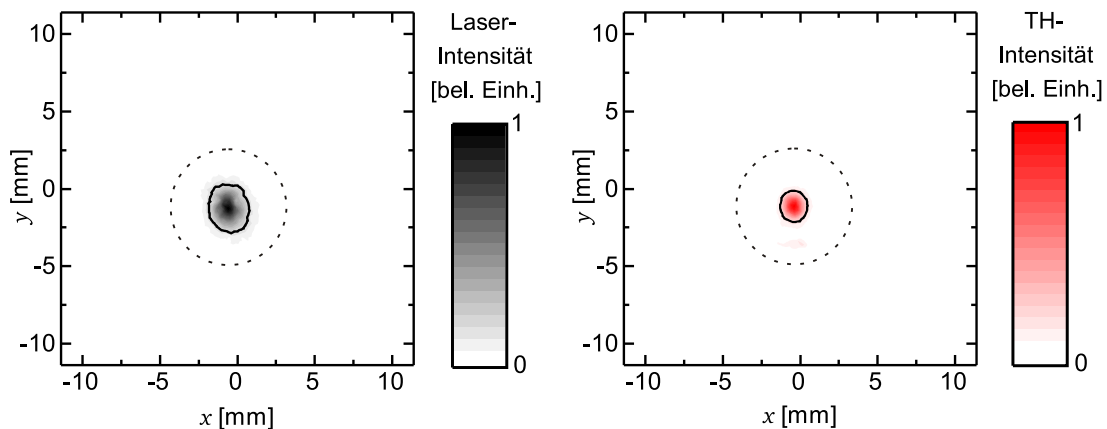


Abbildung 3.10: Gemessene, relative Intensität der fundamentalen Laserstrahlung (links) und der frequenzverdreifachten Strahlung (rechts) aufgetragen gegen die Position der Lochblende in Falschfarbendarstellung. Die Schrittweite zwischen den Messwerte beträgt  $200\text{ }\mu\text{m}$ . Die  $1/e^2$ -Kernbereiche der Intensitätsmaxima sind schwarz umrandet dargestellt. Ein gestrichelter Kreis skizziert den Fokussierungskegel. Dieser Bereich ergibt sich rechnerisch aus der numerischen Apertur des fokussierenden Objektivs  $NA_F = 0,22$ . Der geringe Versatz der Emissionsmaxima gegenüber dem Koordinatenursprung ist durch eine limitierte Positioniergenauigkeit der Lochblendennulllage bedingt. Dieser Versatz ist für die weitere Diskussion irrelevant. Parameter der Messung: Objektiv ( $10\times / NA_F = 0,22$ ), Chopperfrequenz ( $20\text{ kHz}$ ), mittlere Laserleistung ( $1\text{ W}$ ), PMT-Spannung (THG:  $0,62\text{ kV}$ , Laser:  $0,7\text{ kV}$ ), Lock-In-Einstellungen (Eingangsverstärkung (THG: 20, Laser: 20), Ausgangsverstärkung (THG: 150, Laser: 650), Integrationszeit ( $4\text{ ms}$ ), Zeitkonstante ( $500\text{ }\mu\text{s}$ ), Filter-Ordnung (1)).

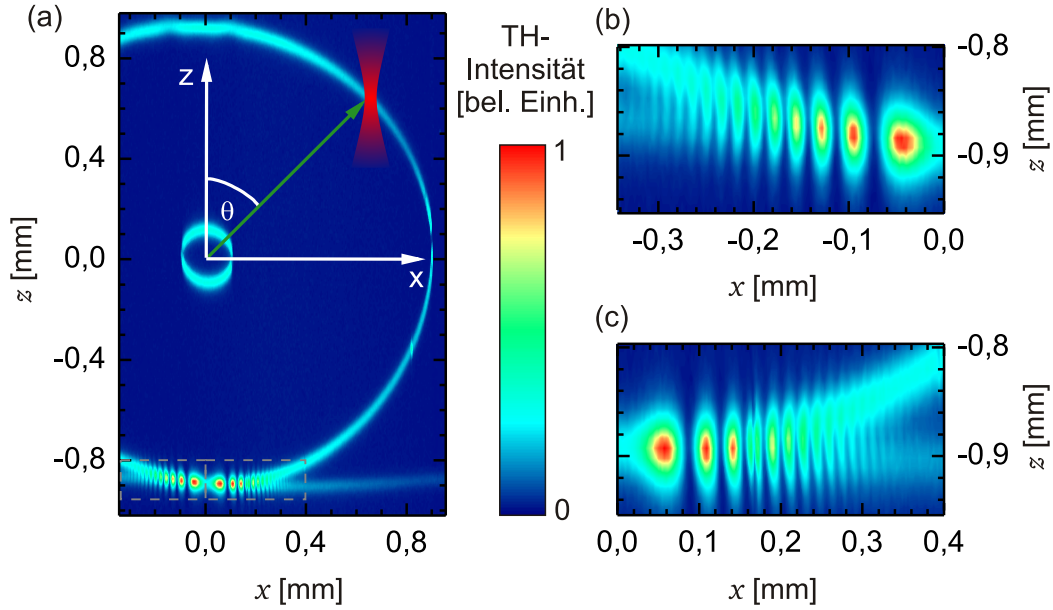


Abbildung 3.11: (a) THM-Aufnahme eines lateralen Schnitts in der  $xz$ -Ebene durch die Kapillare in Falschfarbendarstellung. Die Symmetrieachse der Kapillare ist hierbei entlang der  $y$ -Achse orientiert. Die Aufnahme besteht aus  $1298 \times 501$  Messwerten. Der schematisch eingezeichnete Laserfokus (rot) ist mit einem Punkt auf der äußeren Manteloberfläche überlagert. Die Neigung der Grenzfläche an diesem Punkt wird durch den Winkel  $\theta$  zwischen der Oberflächennormalen (grüner Pfeil) zur optischen Achse ( $z$ -Achse) beschrieben. (b) & (c) Vergrößerung der umrandeten Ausschnitte (grau gestrichelt) der Interferenzstruktur im Kontaktbereich der Kapillare und des Objektträgers. Parameter der Messung: Objektiv ( $10\times / NA_F = 0,22$ ), Chopperfrequenz (20 kHz), mittlere Laserleistung (1 W), THG-PMT-Spannung (0,55 kV), Lock-In-Einstellungen (Eingangsverstärkung (20), Ausgangsverstärkung (150), Integrationszeit (4 ms), Zeitkonstante ( $500 \mu\text{s}$ ), Filter-Ordnung (1)).

dung 3.10 (links) ergibt sich ein Aspektverhältnis von 1 : 1,2 und (rechts) von 1 : 1,17.

Um den Einfluss der Oberflächenorientierung auf die Abstrahlcharakteristik der THM zu untersuchen, wird die Quarzglaskapillare in der gleichen geometrischen Anordnung des vorangegangenen Abschnitts verwendet. Abbildung 3.11 (a) zeigt einen mit der THM aufgenommenen  $xz$ -Schnitt durch die Kapillare in Falschfarbendarstellung. Man erkennt die äußere Manteloberfläche der Kapillare sowie den inneren Hohlraum. Die Kapillare liegt entlang der  $y$ -Achse auf einer gläsernen Bodenplatte, welche durch das Signal bei  $z = -0,9 \text{ mm}$  erkennbar ist. Die Halbwertsbreite der Strukturen ist wie zuvor dargestellt abhängig von der Grenzflächenneigung bezüglich der optischen Achse. Weiterhin lässt sich eine Interferenzstruktur im Kontaktbereich der Kapillare mit der Bodenplatte erkennen. Abbildung 3.11 (b) und (c) zeigen vergrößerte Ausschnitte dieses Bereichs. Hier interferiert die an der Grenzschicht der Bodenplatte erzeugte Strahlung mit der an der Grenzschicht der Kapillare erzeugten Strahlung. Je nach Abstand ist die Interferenz konstruktiv bzw. destruktiv. Eine ähnliche Beobachtung schilderten Moreaux et al. in Aufnahmen der SHM [64].



In dem im vorhergehenden Abschnitt vorgestellten Experiment wurde die Oberfläche des Kapillarinnenraums abgebildet, um alle Oberflächenneigungen in einer Aufnahme zu erhalten und somit eine quantitative Auswertung zu ermöglichen. Im Folgenden soll der Effekt verschiedener Oberflächenneigungen qualitativ diskutiert werden. Daher wird im Experiment der Außenmantel der Kapillare verwendet, da dieser aufgrund seines größeren Krümmungsradius im Bereich der Fokausdehnung in erster Näherung als plane Oberfläche beschrieben werden kann. Zur Vermessung der Abstrahlcharakteristik wird der Laserfokus wie in Abbildung 3.11 skizziert mit einem Punkt auf der äußeren Manteloberfläche überlagert. Die Neigung der Grenzfläche an diesem Punkt wird durch den Winkel  $\theta$  der Oberflächennormalen (grüner Pfeil) zur optischen Achse ( $z$ -Achse) beschrieben.

Abbildung 3.12 zeigt für sechs unterschiedliche Oberflächenneigungen  $\theta$  die gemessenen Emissionsprofile der frequenzverdreifachten Strahlung. Hierbei ist die gemessene Intensität in Falschfarbendarstellung gegen die Lochblendenposition aufgetragen. Das Emissionsprofil der frequenzkonvertierten Strahlung an einer Grenzfläche mit einer Neigung von  $\theta = 30^\circ$  (Abbildung 3.12 (a)) weist ein zentrales Maximum der frequenzverdreifachten Strahlung auf. Dies ähnelt sehr der zuvor diskutierten Abstrahlung an der transversal verlaufenden Grenzfläche des Objektträgers ( $\hat{=} \theta = 0^\circ$ ). Das Maximum verlagert sich für größer werdende Winkel  $\theta$  nach außen, wie Abbildung 3.12 (b) für  $\theta = 75^\circ$  exemplarisch zeigt. Nähert sich die Grenzflächenneigung weiter der optischen Achse (beispielsweise  $\theta = 87^\circ$ ), so ist ein zweites schwächeres Maximum gegenüber dem ersten Maximum erkennbar (siehe Abbildung 3.12 (c)). Im Fall einer zur optischen Achse parallelen Grenzfläche ergeben sich zwei gleichstarke Maxima (siehe Abbildung 3.12 (d)). Für noch größere Winkel wandert das ursprüngliche Maximum weiter nach außen und verliert rasch an Intensität. Das gegenüberliegende Maximum bewegt sich dabei auf die optische Achse zu und wird intensiver (siehe Abbildung 3.12 (e) und (f)). Bemerkenswert ist hierbei, dass die frequenzverdreifachte Strahlung über den maximalen Abstrahlungskegel des Objektivs (gegeben durch die numerische Apertur  $NA_F = 0,22$ ) hinaus emittiert wird. Der Öffnungswinkel des Abstrahlungskegels der fundamentalen Strahlung liegt bei  $12,7^\circ$ , bei der frequenzverdreifachten Strahlung hingegen beträgt er über  $20,6^\circ$ . In Abbildung 3.12 ist die maximale Brechung der fundamentalen Strahlung durch die gestrichelten Kreise skizziert. Das Verhältnis der Intensitäten in den beiden Maxima ist ein Maß für die Orientierung der Oberfläche bzgl. der optischen Achse.

Um die Messungen zu verifizieren, werden diese im Folgenden mit numerischen Simulationen verglichen. Die Simulation erfolgt hierbei durch eine numerische Berechnung der winkelaufgelösten Intensität  $I^{(3\omega)}$  nach Gleichung (1.48). Aufgrund der moderaten, numerischen Apertur des fokussierenden Objektivs wurde das Modell des Gauß-Strahls zur Beschreibung des Laserfokus verwendet. Details zur numerischen Simulation sind in Anhang A zu finden. Abbildung 3.13 zeigt die den Messungen zugehörigen berechneten Abstrahlcharakteristika. Die Simulation bestätigt die experimentellen Beobachtungen. Auch die Ausdehnungen und Abstände stimmen gut überein. Die zu beobachten marginalen Abweichungen sind auf die Elliptizität des Strahlprofils, die Krümmung der Grenzfläche und eine Schwelle in der Detektion zurückzuführen. Durch das hohe Maß an Übereinstim-



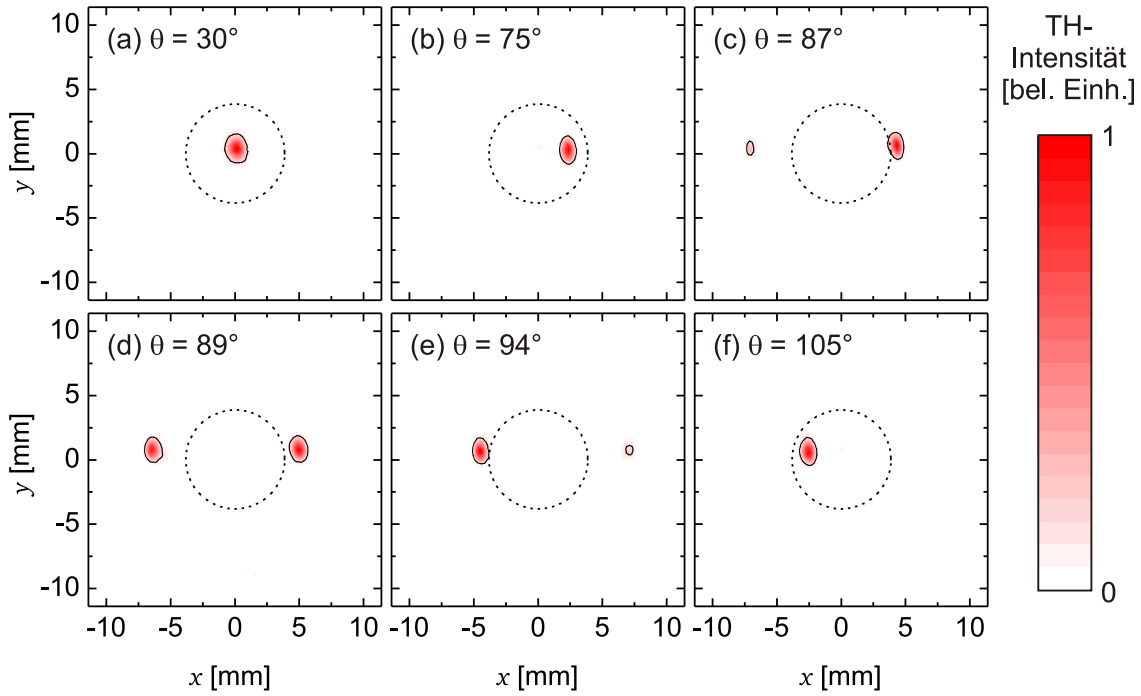


Abbildung 3.12: Gemessene Emissionsprofile der frequenzverdreifachten Strahlung bei unterschiedlichen Neigungen der Grenzflächennormalen zur optischen Achse in Falschfarbendarstellung. Die Definition des Winkels  $\theta$  ist Abbildung 3.11 zu entnehmen. Die Winkel wurden über eine Messung in der  $xz$ -Ebene experimentell bestimmt. Die Unsicherheit der Winkelangaben liegt im Bereich von  $\pm 1^\circ$  [54]. Die Aufnahmen wurden jeweils normiert. Die Schrittweite der Messwerte beträgt  $200\ \mu\text{m}$ . Die  $1/e^2$ -Kernbereiche der Intensitätsmaxima sind schwarz umrandet dargestellt. Ein gestrichelter Kreis skizziert den Fokussierungskegel. Dieser Bereich ergibt sich rechnerisch aus der numerischen Apertur des fokussierenden Objektivs  $NA_F = 0,22$ . Eine geringe Fluktuation der Bildnulllage von bis zu einem Millimeter ist durch eine limitierte Positioniergenauigkeit der Lochblendennulllage bedingt. Diese Fluktuation ist für die weitere Betrachtung vernachlässigbar. Eine detailliertere Betrachtung ist den Quellen [54, 65] zu entnehmen. Parameter der Messung: Objektiv ( $10\times$  /  $NA = 0,22$ ), Chopperfrequenz (20 kHz), mittlere Laserleistung (1 W), THG-PMT-Spannung (0,6 kV), Lock-In-Einstellungen (Eingangsverstärkung (20), Ausgangsverstärkung (150), Integrationszeit (6 ms), Zeitkonstante (1 ms), Filter-Ordnung (1)).

mung stützen sich Messung und Simulation gegenseitig.

Abbildung 3.14 zeigt eine intuitivere Darstellung der simulierten Emissionsprofile. Hierbei wird die normierte Intensität der Strahlung unter dem jeweiligen Winkel durch einen Farbwert und die Entfernung zum Ursprung widergespiegelt. Die Datenpunkte sind zu einer geschlossenen Oberfläche interpoliert. Diese „Strahlungs-Keulen“ sind exemplarisch für drei Grenzflächenneigungen gezeigt. Die „Strahlungs-Keulen“ der Fundamentalstrahlung und der frequenzverdreifachten Strahlung unterscheiden sich bei großen Grenzflächenneigungen  $\theta$  deutlich voneinander (siehe Abbildung 3.14 (b) und (c)).

Die gezeigten experimentellen und simulierten Ergebnisse bestätigen die qualitativen Aussagen der Simulationen von Cheng et al. und Olivier et al. [21, 50]. Sie zeigen ein zentrales Maximum der dritten harmonischen Strahlung auf der optischen Achse für transversal verlaufende Grenzflächen sowie zwei symmetrische Maxima abseits der optischen Achse für longitudinal verlaufende Grenzflächen. Dies lässt sich in einem von Debarre et al. gezeigten Modell qualitativ erklären [66]. Hierbei wird die Phasenanpassung betrachtet. Abbildung 3.15 (a) zeigt die  $k$ -Vektoren für eine transversal verlaufende Grenzfläche (grüne Linie). Die Impulse dreier fundamentaler Photonen  $|\vec{k}_\omega| = k_\omega$  (rote Pfeile) werden bei der THG aufsummiert und jeweils um einen Beitrag der Gouy-Phasenverschiebung reduziert. Dieser Beitrag lässt sich durch den Impulse  $|\vec{k}_g| = k_g$  ausdrücken [66]. Aufgrund der Dispersion ist der für die Erzeugung der dritten Harmonischen nötige Impuls  $|\vec{k}_{3\omega}| = k_{3\omega}$  etwas größer als die der drei fundamentalen Photonen ( $k_\omega$ ). In Abbildung 3.15 wird dies durch den blau, gepunkteten Kreis mit dem Radius  $k_{3\omega}$  veranschaulicht. Betrachtet man die Grenzfläche im Fourier-Raum, so erhält man eine infinitesimal schlanke Verteilung parallel zur Grenzfläche und eine breite Verteilung  $I(k_\perp)$  senkrecht zur Grenzfläche. Der zur Phasenanpassung nötige Beitrag wird durch die senkrecht zur Grenzfläche verlaufenden Raumfrequenzen  $k_\perp$  kompensiert. Hierbei ergeben sich die zwei Möglichkeiten  $\Delta k_I$  (oranger Pfeil) und  $\Delta k_{II}$  (orange gestrichelter Pfeil). Aufgrund der vom Ursprung aus monoton fallenden Verteilung  $I(k_\perp)$  ist die Phasenanpassung in Rückwärtsrichtung (Epi-THG; blau gestrichelter Pfeil) mit  $\Delta k_{II}$  wesentlich unwahrscheinlicher als die Vorwärtsrichtung mit  $\Delta k_I \ll \Delta k_{II}$  (blauer Pfeil). Daher ist die Epi-THG um mindestens einen Faktor hundert weniger intensiv und kann nur unter bestimmten Voraussetzungen detektiert werden [50, 66]. In Abbildung 3.15 (b) ergibt sich aufgrund der Grenzflächenneigung  $\theta = 75^\circ$  und der Beiträge  $\Delta k_I$  und  $\Delta k_{II}$  senkrecht zur Grenzfläche eine Emission der dritten Harmonischen abseits der optischen Achse. Auch hier ist die Emission in Richtung der Phasenanpassung mit  $\Delta k_I$  stärker gegenüber der in Richtung der Phasenanpassung mit  $\Delta k_{II} > \Delta k_I$ . Zudem liegt die Emissionsrichtung der Phasenanpassung mit  $\Delta k_{II}$  (blau gestrichelter Pfeil) so weit abseits der optischen Achse, dass diese sowohl in der Simulation als auch in der Messung nicht beobachtet werden kann. Analog zu den errechneten und gemessenen Emissionsprofilen entfernt sich das intensivere Maximum von der optischen Achse. Zeitgleich bewegt sich das schwächere Maximum auf die optischen Achse zu. Aufgrund der sich dabei angleichenden, benötigten Beiträge zur Phasenanpassung  $\Delta k_I$  und  $\Delta k_{II}$  nähern sich die Maximalintensitäten der beiden Emissionsrichtungen einander an. Abbildung 3.15 (c) zeigt den Fall für eine

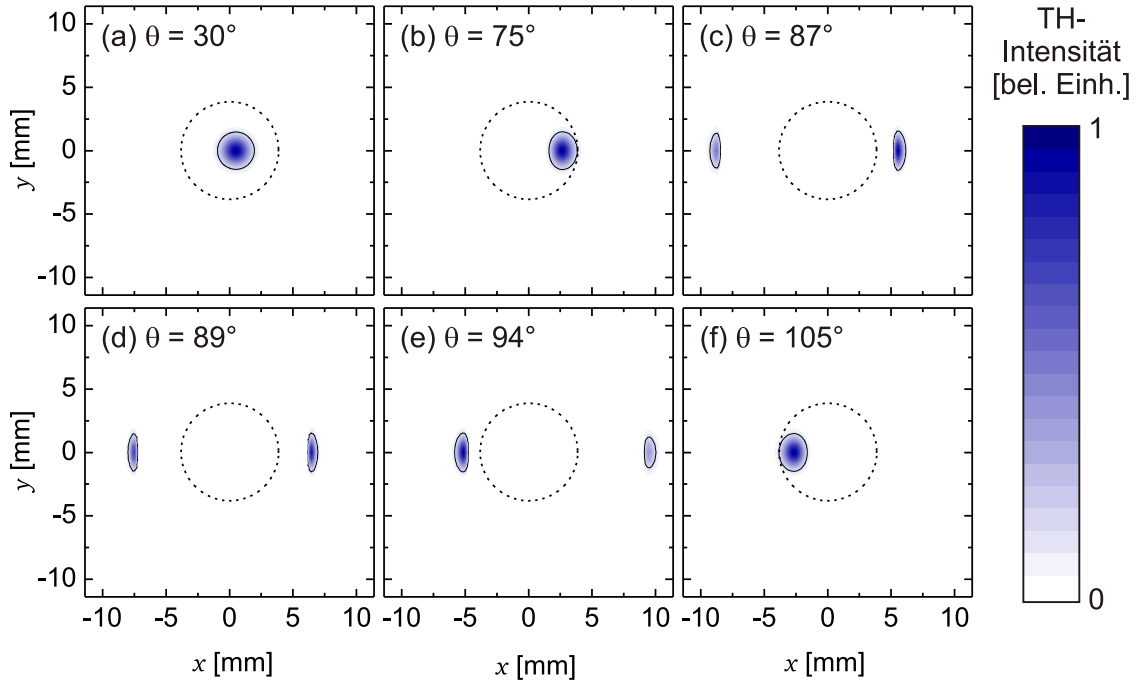


Abbildung 3.13: Numerisch berechnete Emissionsprofile der frequenzverdreifachten Strahlung bei unterschiedlichen Neigungen der Grenzflächennormalen zur optischen Achse in Falschfarbendarstellung. Die weiteren Definitionen sind Abbildung 3.11 zu entnehmen. Physikalische Parameter der Simulation: Wellenlänge ( $\lambda = 810 \text{ nm}$ ), Brechungsindex ( $n(\lambda = 810 \text{ nm}) = 1,453150$  und  $n(\lambda/3 = 270 \text{ nm}) = 1,498$ ), Objektiv ( $NA_F = 0,22$ ,  $f = 16 \text{ mm}$ ), Kondensor ( $NA_K = 0,65$ ),  $1/e^2$ -Laserstrahlradius vor Objektiv ( $w = 1,8 \text{ mm}$ ).

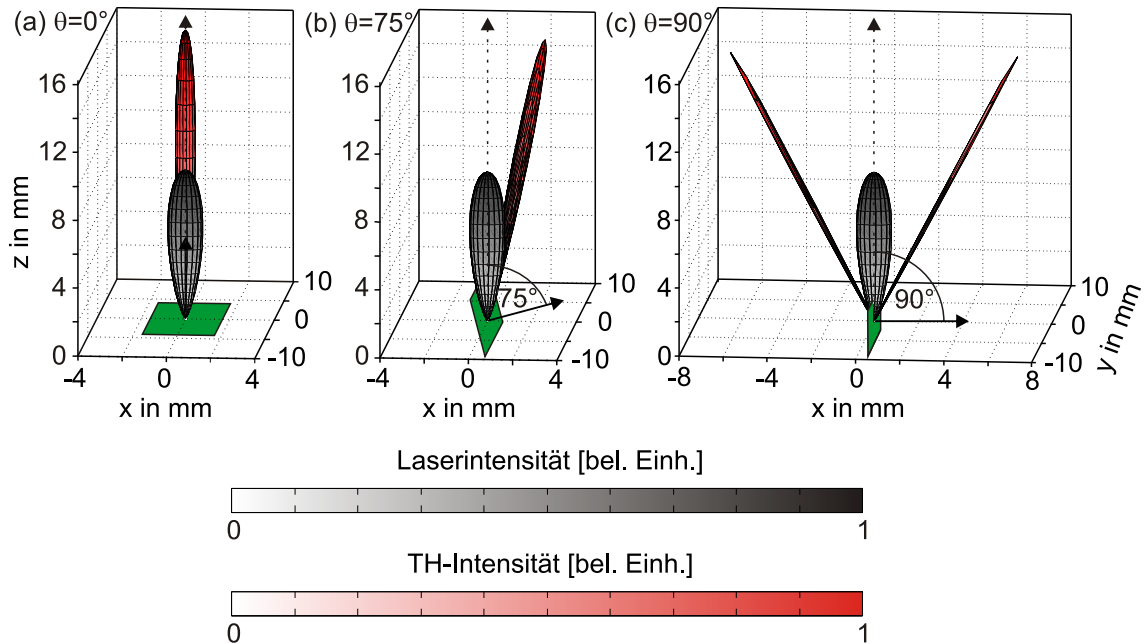


Abbildung 3.14: Alternative Darstellung der simulierten Emissionsprofile aus Abbildung 3.13. Die Graphen wurden jeweils normiert. Die fundamentale Laserstrahlung wurde gegenüber der frequenzverdreifachten Strahlung um einen Faktor zwei vermindert.

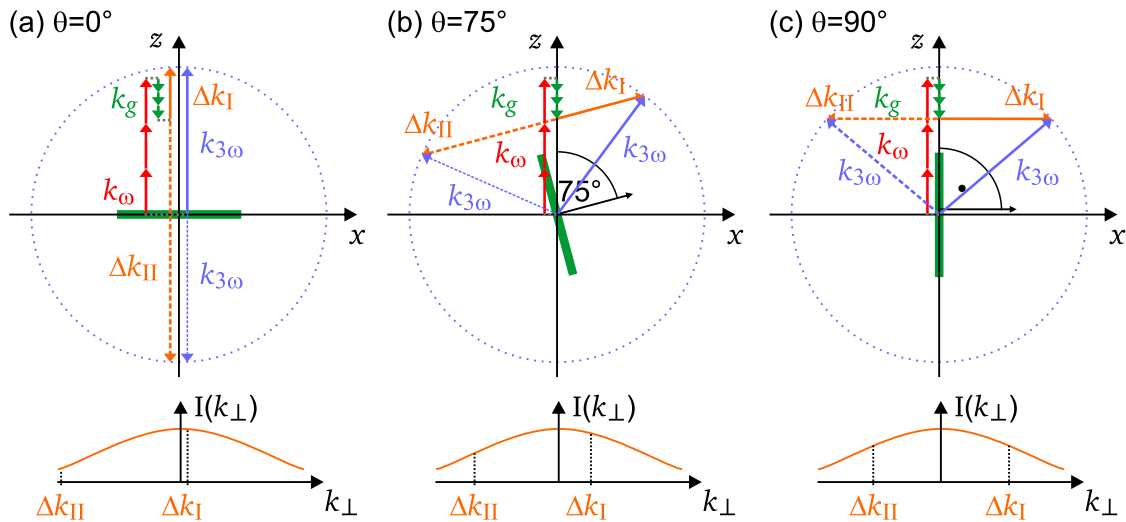


Abbildung 3.15: Modell von Debarre zur Erklärung der Emissionsrichtungen und Intensitätsverteilung der dritten Harmonischen an Grenzflächen unterschiedlicher Neigungswinkel  $\theta$  [66].

longitudinal verlaufende Grenzfläche. Wie in den simulierten und gemessenen Emissionsprofilen zu sehen, resultieren hierbei zwei gleich intensive Emissionen mit einer zur Grenzfläche symmetrischen Emissionsrichtung. Die Emissionsrichtungen und deren Intensität für größere Grenzflächenneigungen  $\theta$  als  $90^\circ$  ergeben sich durch eine Spiegelung an der  $z$ -Achse.

In diesem Modell wirken sich unterschiedlich starke Fokussierungen auf den Beitrag der Gouy-Phasenverschiebung aus. Der Betrag des  $k$ -Vektors  $k_g$  wächst in erster Näherung quadratisch mit der numerischen Apertur des fokussierenden Objektivs [66]. Abbildung 3.16 (links) stellt diesen Einfluss dar. Für eine moderate Fokussierung ergibt sich eine moderate Gouy-Phasenverschiebung  $k_g$  (grüne, durchgezogene Pfeile). Eine stärkere Fokussierung resultiert in einer größeren Gouy-Phasenverschiebung  $k'_g$  (grüne, gestrichelte Pfeile). Dies führt in diesem Modell zu einer Emission der dritten Harmonischen (blau gestrichelte Pfeile) mit größerem Öffnungswinkel gegenüber der moderaten Fokussierung (blaue, durchgezogene Pfeile). Dieser Effekt zeigt sich auch den berechneten Emissionsprofilen. Abbildung 3.16 (rechts) zeigt die zur Detektion der dritten Harmonischen nötige numerische Apertur  $NA_{TH}$  für longitudinal verlaufende Grenzflächen aufgetragen gegen die numerische Apertur der Fokussierung  $NA_F$ . Es ist ein monoton wachsender Verlauf zu erkennen. Die simulierten numerischen Aperturen  $NA_{TH}$  sind bis  $NA_F \approx 0,4$  größer als die numerische Apertur der Fokussierung. Weiterhin liegen die Ergebnisse der Simulation stets über der numerischen Apertur, die sich aus der intuitiven Beziehung  $(1/\sqrt{3})$  zur Ausdehnung der Fundamentalstrahlung ergibt. Die Abbildung zeigt, dass die Auswirkung der THG-Emissionsprofile an longitudinal verlaufenden Grenzflächen für geringe und moderate Fokussierungen besonders groß ist.

Die Messungen zeigen erstmals (in sehr guter Übereinstimmung zur Simulation) die Abstrahlcharakteristik im Übergang von transversal zu longitudinal

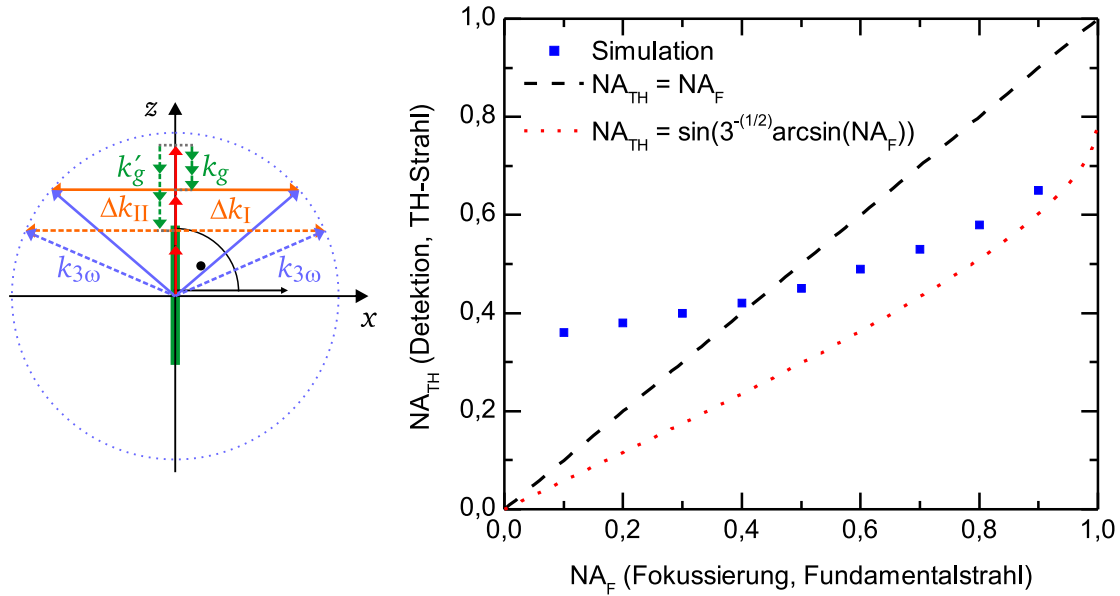


Abbildung 3.16: Auswirkung der numerischen Apertur der Fokussierung auf die TH-Emission an parallel zur optischen Achse verlaufenden Grenzflächen. (links) Qualitative Betrachtung der Auswirkung im Modell von Debarre. (rechts) Nötige numerische Apertur zur TH-Detektion  $NA_{TH}$  aufgetragen gegen die numerische Apertur der Fokussierung  $NA_F$ . Blaue Quadrate zeigen die simulierten numerischen Aperturen der Detektion  $NA_{TH}$ . Die schwarz gestrichelte Linie eine mit der Fokussierung identischen numerischen Apertur und der rot gepunktete Verlauf die numerische Detektion  $NA_{TH}$ , die sich aus dem intuitiven Ansatz der Frequenzverdreifung ergibt.

verlaufenden Grenzflächen. Zudem erkennt man an den Ergebnissen, dass für Grenzflächen parallel zur optischen Achse die Emissionsmaxima der frequenzverdreifachten Strahlung (Öffnungswinkel von  $20,6^\circ$ ) außerhalb der Verteilung der fundamentalen Strahlung (Öffnungswinkel von  $12,7^\circ$ ) liegt. Entgegen bisherigen, vereinfachenden Annahmen in der Literatur reicht daher eine geringere numerische Apertur des Kondensors als die numerische Apertur des fokussierenden Objektivs nicht aus [58]. Im diskutierten Experiment ist eine numerische Apertur der Detektion von mindestens  $NA_{TH} = 0,35$  nötig (bei einer numerischen Apertur des fokussierenden Objektivs von  $NA_F = 0,22$ ). Aufgrund einer zu geringen numerischen Apertur im Detektionsstrahlengang konnten vermutlich in früher publizierten Arbeiten anderer Autoren keine longitudinal verlaufenden Grenzflächen beobachtet werden [47–49].

Als weitere wichtige Konsequenz der beobachteten Abstrahlcharakteristik ist die Möglichkeit von multifokalen Anordnungen zur mikroskopischen Abbildung kritisch zu hinterfragen. Abbildung 3.17 macht dies exemplarisch deutlich. Mit einem ähnlichen Aufbau konnten Oron und Silberberg einen Linienfokus erzeugen und in der THM verwenden [67]. Eine damit aufgenommene biologische Probe ist in Abbildung 3.18 dargestellt. Die eigentliche Struktur der Probe ist von einer Intensitätsoszillation umgeben. Neben den in der Referenz genannten

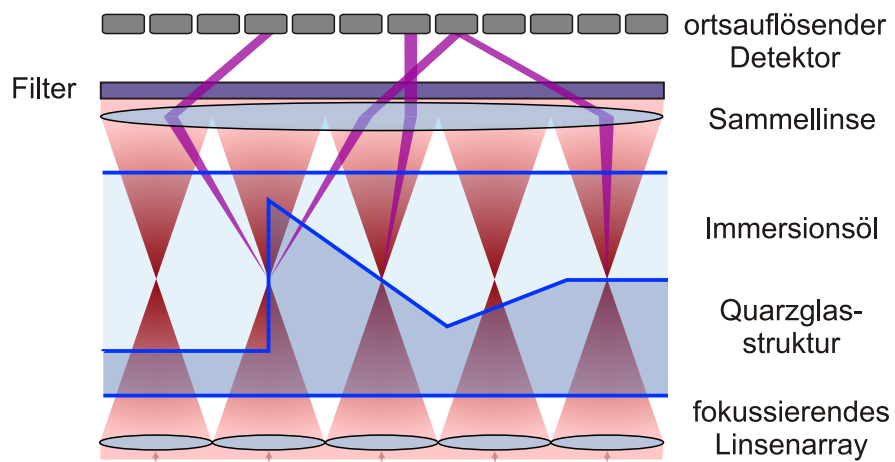


Abbildung 3.17: Eindimensionaler, multifokaler THM-Aufbau mit Linsenarrays. Als fiktive Probe wurde eine Struktur in Quarzglas bedeckt von Immersionsöl verwendet. Eine Sammellinse dient zur Kollimation der erzeugten Strahlung. Nach spektraler Selektion wird die erzeugte Strahlung mit einem ortsauflösenden Detektor vermessen. Zur vereinfachten Darstellung wird die Lichtbrechung in der Probe vernachlässigt.

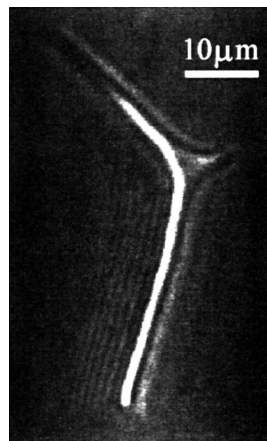


Abbildung 3.18: THM-Aufnahme des Gewebes eines Seeigels (lat.: *sea urchin*) auf einem Objektträger (aus [67]). Die Aufnahme wurde mit einer verstärkten CCD gemessen.

Abbildungsfehlern könnte die Abstrahlcharakteristik an longitudinal verlaufenden Grenzflächen mit zu diesem beobachteten Effekt beitragen.

Wie Abbildung 3.17 zeigt, werden durch ein Linsenarray mehrere Laserfokusse erzeugt. Die numerische Apertur von Linsenarrays liegt typischerweise im Bereich der im Experiment verwendeten [68]. Treffen die Laserfokusse auf Grenzflächen zwischen zwei Medien, wird Strahlung der dritten Harmonischen erzeugt. Je nach Neigung der Grenzfläche zur optischen Achse wird die dritte Harmonische in unterschiedliche Richtungen emittiert. Dies führt zum einen zu Interferenz und zum anderen zur Detektion von erzeugter Strahlung aus benachbarten Fokussen. Dadurch kann es zu Fehlinterpretationen der Aufnahme kommen. Daher können einfache multifokale Ansätze nur in Proben mit ebenen Strukturen angewandt werden oder müssen durch eine zusätzliche, korrekt abbildende Optik vor dem Detektor verwandt werden.

### 3.3 Abhängigkeit der Frequenzkonversion von der Grenzflächenorientierung

#### 3.3.1 Intensität und räumliche Auflösung der Frequenzkonversion

Im vorherigen Unterkapitel wurde diskutiert, wie sich die Neigung der Oberfläche (im Bezug auf die optische Achse) auf das emittierte TH-Intensitätsprofil auswirkt. Jetzt soll untersucht werden, wie sich eine Variation der Laserpolarisation (bzw. eine Variation der Grenzflächenorientierung im Bezug auf die Laserpolarisation) in der SHM und THM auswirkt. Dazu wird in einem weiteren Experiment die Symmetrieachse der Quarzglaskapillare) entlang der optischen Achse ( $z$ -Achse) ausgerichtet (siehe Abbildung 3.19). Die Manteloberfläche der Kapillare ist in der gewählten Konfiguration stets parallel zur optischen Achse ausgerichtet. Abbildung 3.20 zeigt zwei  $xy$ -Schnitte der THM durch den Hohlraum der Kapillare, (links) mit horizontaler Polarisation, (rechts) mit vertikaler Polarisation. Man erkennt

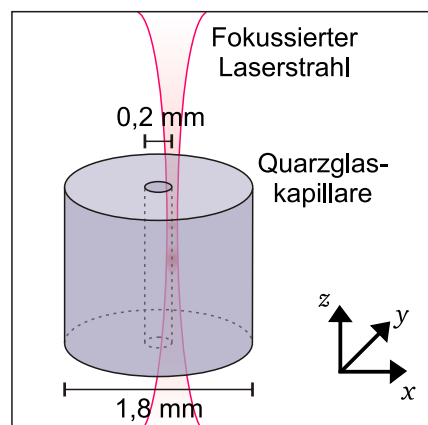


Abbildung 3.19: Geometrie und Orientierung zur Messung des Einflusses der Oberflächenorientierung auf die SHM und THM.

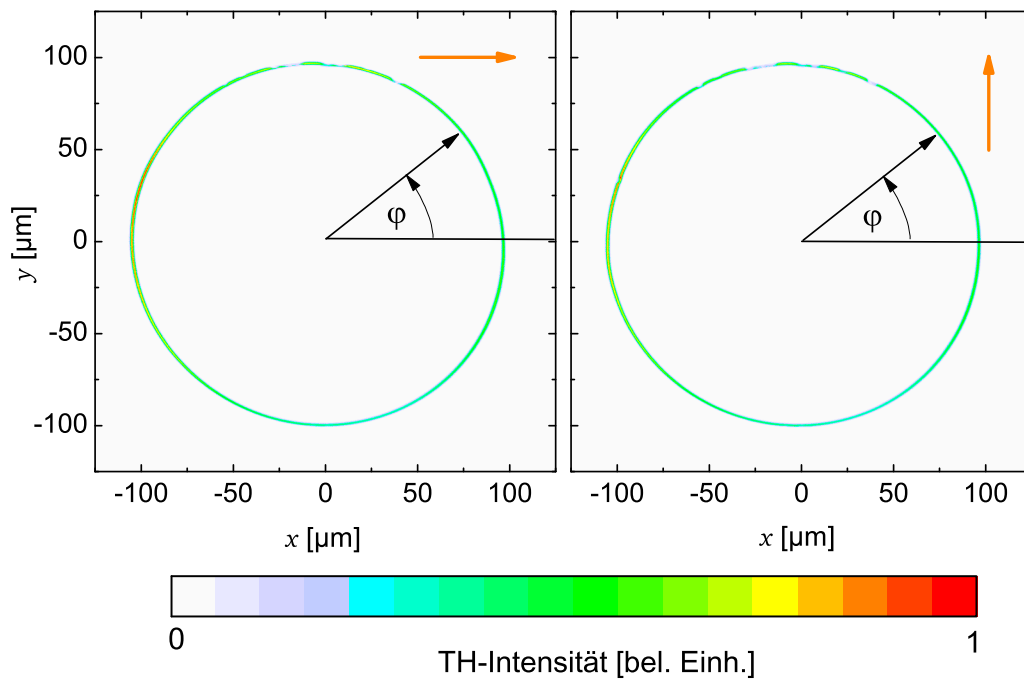


Abbildung 3.20: Zweidimensionale laterale Schnitte in der  $xy$ -Ebene einer THM-Aufnahme durch die Kapillare (links) mit horizontaler Laserpolarisation, (rechts) mit vertikaler Laserpolarisation (dargestellt durch orange Pfeile). Die Polarisation wurde mit Hilfe einer Halbwellenplatte gedreht. Die Güte der linearen Polarisation wurde bestimmt zu etwa 100 : 1 (nicht dargestellt). Die Darstellung besteht aus  $1000 \times 1000$  Datenpunkten. Parameter der Messung: Objektiv ( $10\times / NA_F = 0,22$ ), Chopperfrequenz (50 kHz), mittlere Laserleistung (1 W), THG-PMT-Spannung (0,35 kV), Lock-In-Einstellungen (Eingangsverstärkung (20), Ausgangsverstärkung (150), Integrationszeit (4 ms), Zeitkonstante (500  $\mu$ s), Filter-Ordnung (1)).

deutlich den Übergang vom Immersionsöl (innen) zum Quarzglas (außen) in Form eines Kreises. Im Gegensatz zur zuvor betrachteten Aufnahme (Abbildung 3.4) ist hier ein gleichmäßig scharfer Intensitätsverlauf erkennbar. Dies ist auf die in  $x$ - und  $y$ -Richtung symmetrische, geringe Fokusausdehnung zurückzuführen (siehe Abschnitt 1.2). Die Grenzflächenorientierung zur Laserpolarisation, welche parallel zur  $x$ -Achse ist (Abbildung 3.20 (links)), ändert sich kontinuierlich entlang der Kapillarwand. Die Orientierung der Kapillarwand wird durch den Azimutwinkel  $\varphi$  zwischen der  $x$ -Achse zur Wandnormalen (schwarzer Pfeil) beschrieben. Vergleicht man die beiden Darstellungen zeigt sich keine Änderung durch die Polarisationsdrehung und die Maximalintensitäten weisen sehr ähnliche Verläufe auf. Die Signalschwankungen sind auf die ortsabhängige Detektionseffizienz und Variationen der optischen Eigenschaften in der Probe zurückzuführen. Die Detektionseffizienz variiert aufgrund einer limitierten Justagegenauigkeit des Galvo-Scanners sowie örtlichen Schwankungen der Detektor-Effizienz. Um die Messungen unabhängig von diesen Schwankungen bewerten zu können, zeigt Abbildung 3.21 die punktweise ermittelte Differenz der Messwerte aus den Abbildungen 3.20 (links) und



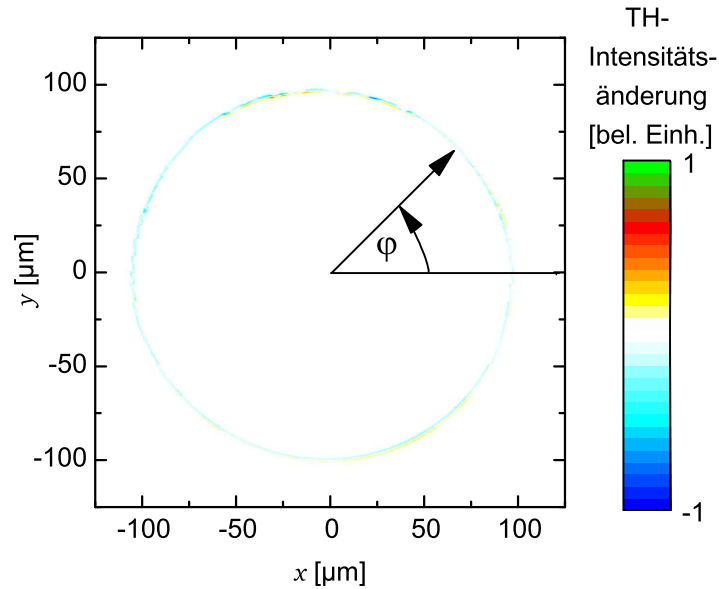


Abbildung 3.21: Zweidimensionale Konturdarstellung der Änderung der TH-Intensität bei Drehung der Laserpolarisation um  $90^\circ$  (horizontale und vertikale Polarisation, siehe Abbildung 3.20).

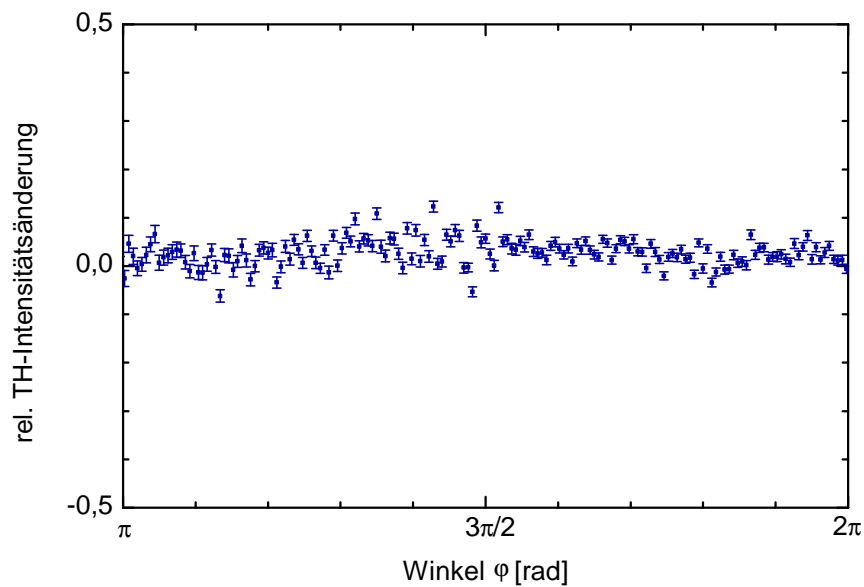


Abbildung 3.22: Relative Änderung der TH-Intensität entlang der Kapillaroberfläche (siehe Abbildung 3.21) aufgetragen gegen den Winkel  $\varphi$ . Aus Symmetriegründen der Probe ist hier der Winkel  $\varphi$  im Bereich zwischen  $\pi$  und  $2\pi$  dargestellt. Die Ausreißer rund um  $\varphi = 3\pi/2$  sind auf die geringen Absolutwerte und damit größere relative Streuung zurückzuführen.

(rechts). Die Variation der Intensität ist für alle Punkte gering. Lediglich eine sehr schwache Kontur ist erkennbar. Um eine quantitative Auswertung zu ermöglichen, stellt Abbildung 3.22 die relative Änderung der detektierten Maximalintensität der THM entlang der Kapillarwand gegen den Winkel  $\varphi$  dar. Zur Bestimmung des Maximalwerts wurde an radiale Schnitte jeweils eine Gauß-Kurve angepasst. Die relative Intensitätsänderung fluktuiert statistisch zwischen  $-10\%$  und  $10\%$  und liegt im Mittel bei null. Simulationen von Cheng et al. und Olivier et al. zeigen Modulationen von bis zu  $35\%$ , allerdings mit sich widersprechenden Vorzeichen. Cheng et al. sagen einen Intensitätsrückgang der dritten Harmonischen um  $20\%$  bei einer Polarisationsdrehung von parallel zu orthogonal zur Grenzfläche vorher. Hingegen berechnen Olivier et al. hier eine Intensitätssteigerung von  $35\%$ . Beide Abbildungen 3.21 und 3.22 weisen im Rahmen der Messgenauigkeit keine systematische Modulation des THM-Signals bei Drehung der Laserpolarisation auf. Aufgrund der Datenstreuung ist eine Modulation kleiner als  $5\%$  nicht auszuschließen. Die Streuung resultiert aus der limitierten Repositionierbarkeit des Laserfokus sowie aus den Fluktuationen der Laserpulse. In Anhang A.2 wird der Einfluss der Grenzflächenorientierung bezüglich der Laserpolarisation auf die Intensität der dritten Harmonischen theoretisch untersucht. Daraus ist zu entnehmen, dass für die im Experiment gewählte, moderate Fokussierung eine Modulationstiefe von  $5\%$  zu erwarten ist. Das Experiment zeigt, dass die Modulationstiefe definitiv nicht höher als  $5\%$  sein kann. Die Simulation bestätigt den von Cheng et al. beobachteten Trend: Die Konversionseffizienz der Frequenzverdreifung ist für Grenzflächen parallel zur Laserpolarisation am größten [21]. Die mit  $5\%$  deutlich geringere Modulationstiefe als bei Cheng et al. ist dabei auf veränderte Parameter der Simulation, vor allem auf die stärkere Fokussierung ( $NA = 1,4$ ), zurückzuführen [21]. Die theoretische Abhängigkeit der Modulationstiefe von der numerischen Apertur ist in Anhang A zu finden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass im Rahmen der Messgenauigkeit für die verwendeten Parameter kein Einfluss der Laserpolarisationsrichtung auf die THM messbar ist. Dies ist aufgrund der Isotropie der Probe intuitiv zu erwarten.

Wie die dreidimensionale SHM-Aufnahme in Abbildung 3.2 bereits zeigte, ermöglicht das Experiment neben der Untersuchung der THM auch eine Untersuchung der SHM. Abbildung 3.23 zeigt die punktweise ermittelte Differenz zweier SHM- $xy$ -Schnitte orthogonaler Laserpolarisation. Im Gegensatz zu Abbildung 3.21 ist die Kapillarwand hier deutlich erkennbar. Die Intensitätsänderung der zweiten Harmonischen zeigt eine symmetrische Modulation. Die Extremwerte werden jeweils auf gegenüberliegenden Seiten der Kapillarwand erreicht. Zur quantitativen Auswertung ist in Abbildung 3.24 die relative Intensitätsänderung entlang der Kapillarwand gegen den Winkel  $\varphi$  aufgetragen. Die Maximalintensität wurde dazu durch die Anpassung einer Gauß-Kurve des jeweiligen Schnitts ermittelt. Der Winkel  $\varphi$  beschreibt wie zuvor den Winkel zwischen der  $x$ -Achse und der Wandnormalen. Im Verlauf der Datenpunkte ist eine Signalerhöhung von bis zu  $300\%$  erkennbar. Die erzeugte Strahlung der zweiten Harmonischen ist daher sehr sensitiv auf die Laserpolarisation. Die Suszeptibilität zweiter Ordnung (Tensor dritter Stufe) ist durch eine Nahfeldordnung im amorphen Quarzglas nicht Null. Dies

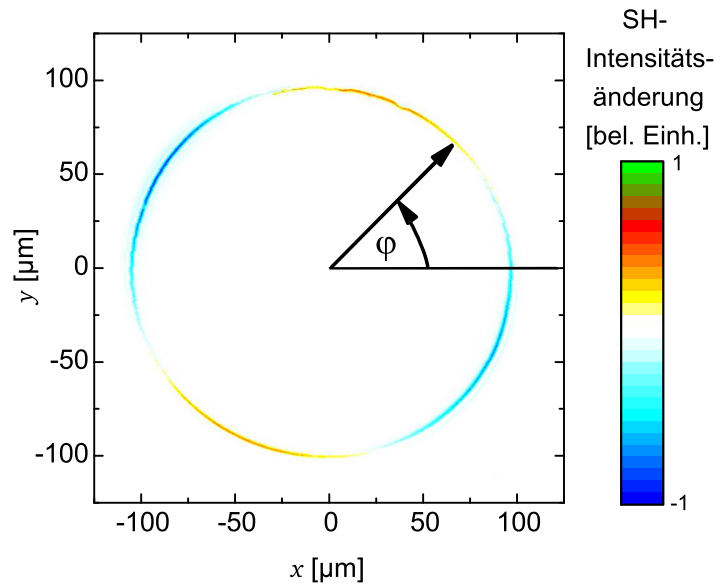


Abbildung 3.23: Zweidimensionale Konturdarstellung der Änderung der Intensität der zweiten Harmonischen (SH) bei Drehung der Laserpolarisation um  $90^\circ$  (horizontale und vertikale Polarisation). Parameter der Messung: Objektiv ( $10\times / NA_F = 0,22$ ), Chopperfrequenz (50 kHz), mittlere Laserleistung (1 W), SHG-PMT-Spannung (0,6 kV), Lock-In-Einstellungen (Eingangsverstärkung (20), Ausgangsverstärkung (650), Integrationszeit (4 ms), Zeitkonstante ( $500\ \mu\text{s}$ ), Filter-Ordnung (1)).

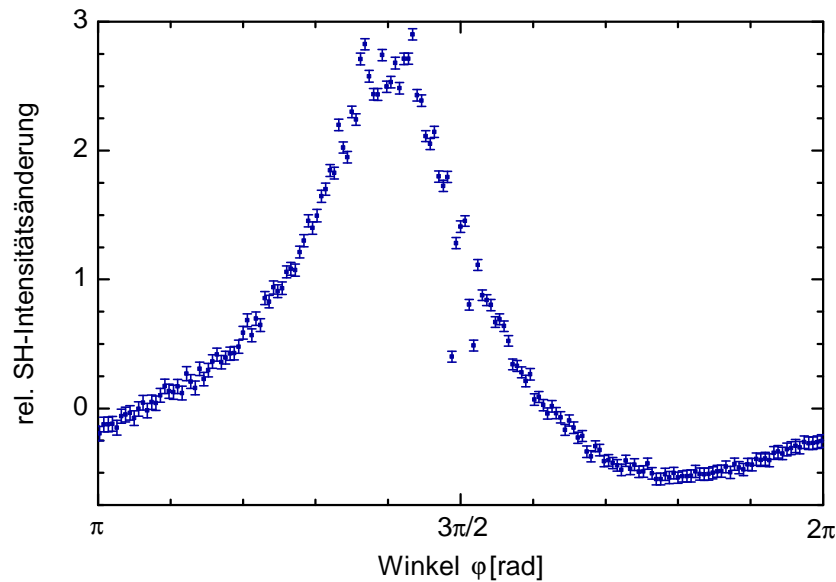


Abbildung 3.24: Relative Änderung der Intensität der zweiten Harmonischen (SH) entlang der Kapillaroberfläche aufgetragen gegen den Winkel  $\varphi$ . Aus Symmetriegründen ist hier der Winkel  $\varphi$  nur im Bereich zwischen  $\pi$  und  $2\pi$  dargestellt. Die Ausreißer rund um  $\varphi = 3\pi/2$  sind auf die geringen Absolutwerte und damit größere relative Streuung zurückzuführen.

führt zu der beobachteten Polarisationsabhängigkeit der Erzeugung der zweiten Harmonischen [55]. Daher ist in der SHM im Gegensatz zur THM durch eine jeweils geeignete Wahl der Laserpolarisation eine Signalüberhöhung in Quarzglas beobachtbar.

### 3.3.2 Einfluss der Orientierung longitudinal verlaufender Grenzflächen auf die Abstrahlcharakteristik der THM

In Abschnitt 3.2.2 wurde gezeigt, dass das Emissionsprofil der dritten Harmonischen an longitudinal verlaufenden Grenzflächen zwei nicht-zentrische Maxima aufweist. Im Folgenden werden die Emissionsprofile der dritten Harmonischen an der parallel zur optischen Achse ausgerichteten Kapillare vorgestellt. Hierbei wird der Einfluss der Grenzflächenorientierung auf die Ausrichtung der Maxima des Emissionsprofils untersucht. Abbildung 3.25 zeigt einen  $xy$ -Schnitt durch die Kapillare aufgenommen mit der THM. Das Zentrum der Kapillare wurde als Ursprung des Koordinatensystems gewählt. Der Ursprung wird von dem mit Immersionsöl gefüllten Innenraum umgeben, welcher von dem Signal am Übergang zur Kapillarwand eingegrenzt wird. Der erkennbare Viertelkreis zeigt die Grenzfläche des Außenmantels der Kapillare. Der Laserfokus wird, wie in der Abbildung skizziert, mit der Grenzfläche des Außenmantels überlagert und das Emissionsprofil der

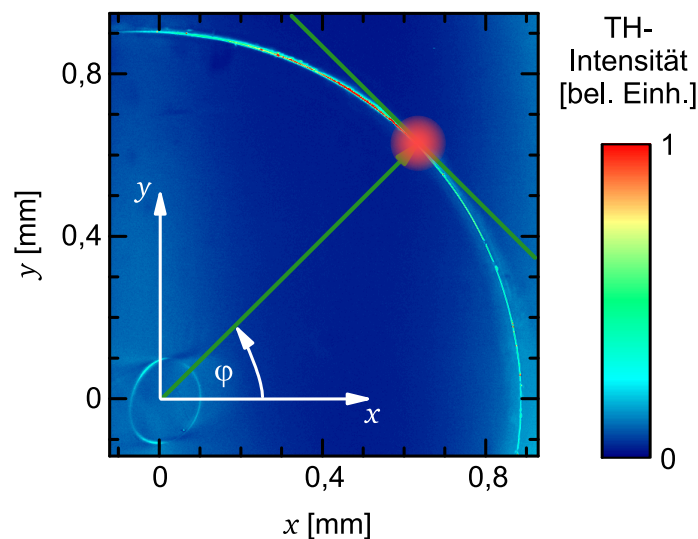


Abbildung 3.25: THM-Aufnahme eines lateralen Schnitts in der  $xy$ -Ebene durch die Kapillare in Falschfarbendarstellung. Die Symmetrieachse der Kapillare ist hierbei entlang der  $z$ -Achse orientiert. Die Aufnahme besteht aus  $1000 \times 1000$  Messwerten. Der schematisch eingezeichnete Laserfokus (rot) ist mit einem Punkt auf der äußeren Manteloberfläche überlagert. Die Orientierung der Grenzfläche an diesem Punkt wird durch den Azimutwinkel  $\varphi$  der  $x$ -Achse zur Oberflächennormalen (grüner Pfeil) beschrieben. Parameter der Messung: Objektiv ( $10\times$  /  $NA_F = 0,22$ ), Chopperfrequenz (20 kHz), mittlere Laserleistung (0,33 W), THG-PMT-Spannung (0,7 kV), Lock-In-Einstellungen (Eingangsverstärkung (20), Ausgangsverstärkung (150), Integrationszeit (6 ms), Zeitkonstante (1 ms), Filter-Ordnung (1)).

dritten Harmonischen vermessen. Zur Beschreibung der Oberflächenorientierung in diesem Punkt wird der Winkel  $\varphi$  von der  $x$ -Achse zur Oberflächennormalen (grüner Pfeil) verwendet. Aufgrund der geringen transversalen Fokausdehnung sind scharfe Grenzflächen erkennbar. Der Laserfokus wird mit der longitudinal verlaufenden Manteloberfläche überlagert. Dadurch können unterschiedliche Grenzflächenorientierungen untersucht werden. Neben der Oberflächennormalen ist in Abbildung 3.25 eine Tangente (grüne Linie) an die Oberfläche der Kapillare im betrachteten Punkt eingezeichnet.

Abbildung 3.26 zeigt die zweidimensionalen Emissionsprofile der dritten Harmonischen an drei unterschiedlichen Oberflächenorientierungen. Diese wurden, wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, mittels der punktwisen Abtastung durch die Lochblende gemessen.

Die experimentellen und simulierten Graphen liegen jeweils zum Vergleich direkt übereinander. Um sicherzustellen, dass auch unter Rotation und Fluktuation der Abstrahlcharakteristik das gesamte Emissionsprofil vermessen wird, wurde im Vergleich zu den Messungen und Simulationen in Abschnitt 3.2.2 der Abstand zum Kondensor auf 8 mm verringert. Dadurch ist die Ausdehnung des Emissionsprofils in Abbildung 3.26 kleiner als in Abbildung 3.12. Graph 3.26 (a) beschreibt eine ähnliche geometrische Situation, wie sie bereits in Abschnitt 3.2.2 betrachtet wurde. Die Grenzfläche ist nahezu orthogonal zur  $x$ -Achse ( $\theta \approx 90^\circ$ ,  $\varphi \approx 0^\circ$ ). Die Laserpolarisation ist parallel zur  $x$ -Achse ausgerichtet. Daher ist ein sehr ähnliches Emissionsprofil der dritten Harmonischen wie in Abbildung 3.10 gezeigt. Es entstehen zwei Maxima, die entlang der  $x$ -Achse versetzt zur optischen Achse auftreten. Die Maxima der THG-Emission liegen klar außerhalb der numerischen Apertur der Fundamentalstrahlung. Im Gegensatz zum Gauß-Profil der Fundamentalstrahlung zeigt die THG-Emission eine Doppel-Struktur mit großem Öffnungswinkel. Die grüne Linie zeigt die gemessene Orientierung der Grenzfläche mit einem Winkel  $\varphi = -1^\circ$  der Normalen zur  $x$ -Achse. Die Verbindungslinie zwischen den beiden Maxima ist nahezu senkrecht zur Grenzfläche (grüne Linie). Bei Variation der Grenzflächenorientierung zu einem Winkel  $\varphi = 44^\circ$  (siehe Abbildung 3.12 (b)) dreht sich die Orientierung des Emissionsprofils ebenfalls. Es sind zwei Maxima zu erkennen, die sich entlang einer orthogonal zur Grenzfläche stehenden Verbindungslinie gegenüberliegen. Abbildung 3.26 (c) zeigt ein drittes Emissionsprofil bei einer Grenzflächenorientierung von  $\varphi = 89^\circ$ . Auch in diesem Emissionsprofil sind zwei Maxima zu sehen. Die Verbindungsachse der beiden Maxima steht senkrecht zur Grenzfläche. Im Gegensatz zu den beiden Emissionsprofilen in Abbildung 3.26 (a) und (b) ist das Verhältnis der Intensitäten in den beiden Maxima nicht gleich. Zusätzlich weisen die beiden Maxima einen etwas vergrößerten Abstand voneinander auf. Diese beiden Effekte sind auf einen geringen Winkel der Kapillare zur Strahlachse von etwa  $\theta = 1,2^\circ$  in negativer  $y$ -Richtung zurückzuführen.

Die gemessenen Emissionsprofile der dritten Harmonischen stimmen sehr gut mit den numerischen Simulationen bezüglich Form, Abstand und Orientierung überein. Lediglich der Durchmesser der Maxima ist in der Messung etwa um einen Faktor zwei größer. Dies ist auf ein Verschmieren der Maxima durch die Messung mit einer  $400\,\mu\text{m}$ -Lochblende in  $200\,\mu\text{m}$ -Schritten zurückzuführen. Eine weite-

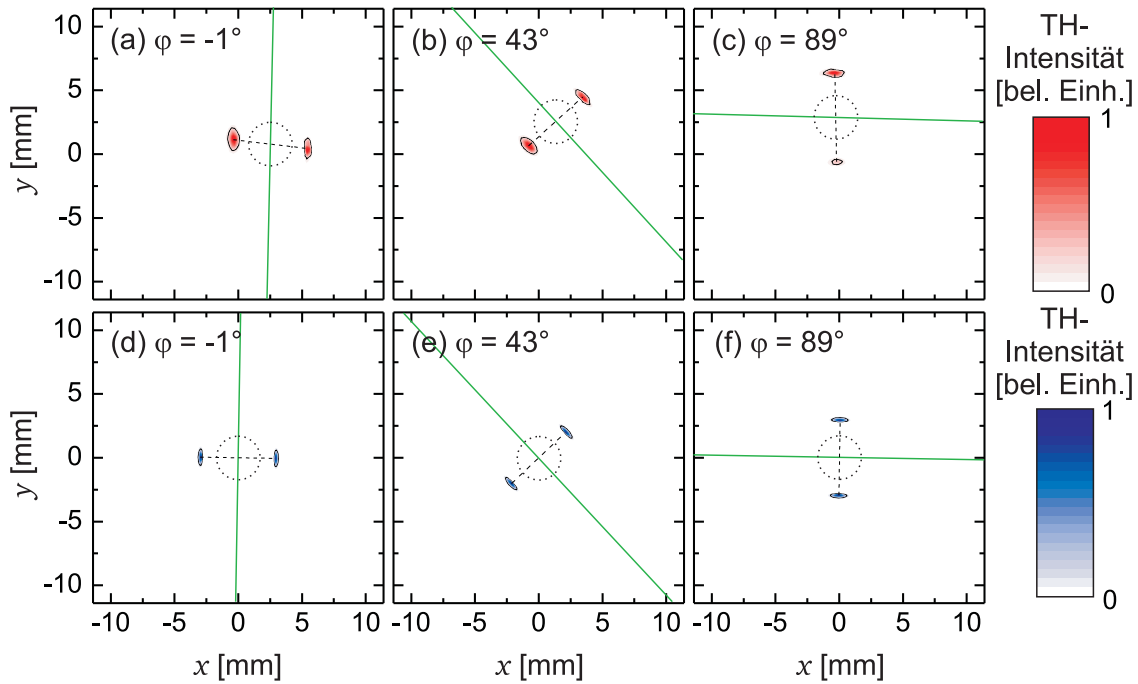


Abbildung 3.26: Gemessene (a-c) und simulierte (d-e) Emissionsprofile der frequenzverdreiften Strahlung bei unterschiedlichen Grenzflächenorientierungen zur  $x$ -Achse in Falschfarbendarstellung. Die Definition des Winkels  $\varphi$  ist Abbildung 3.25 zu entnehmen. Die Winkel wurden über eine Messung in der  $xy$ -Ebene experimentell bestimmt. Die Unsicherheit der Winkelangaben liegt im Bereich von  $\pm 1^\circ$  [54]. Die Aufnahmen wurden jeweils normiert. Der Abstand zwischen den Messpunkten beträgt  $200\ \mu\text{m}$ . Die  $1/e^2$ -Kernbereiche der Intensitätsmaxima sind schwarz umrandet dargestellt. Ein gestrichelter Kreis skizziert den Fokussierungskegel. Dieser Bereich ergibt sich rechnerisch aus der numerischen Apertur des fokussierenden Objektivs  $NA_F = 0,22$ . Die Zentren der beiden Maxima sind mit einer gestrichelten Linie verbunden. Eine Fluktuation der Bildnulllage von bis zu einem Millimeter ist durch eine limitierte Positioniergenauigkeit der Lochblendennulllage bedingt. Diese Fluktuation ist für die weitere Betrachtung irrelevant. Parameter der Messung: Objektiv ( $10\times$  /  $NA_F = 0,22$ ), Chopperfrequenz (20 kHz), mittlere Laserleistung (1 W), THG-PMT-Spannung (0,65 kV), Lock-In-Einstellungen (Eingangsverstärkung (20), Ausgangsverstärkung (150), Integrationszeit (4 ms), Zeitkonstante (500  $\mu\text{s}$ ), Filter-Ordnung (1)). Physikalische Parameter der Simulation: Wellenlänge ( $\lambda = 810\ \text{nm}$ ), Brechungsindex ( $n(\lambda = 810\ \text{nm}) = 1,453150$  und  $n(\lambda/3 = 270\ \text{nm}) = 1,498$ ), Objektiv ( $NA_F = 0,22$ ,  $f = 16\ \text{mm}$ ), Kondensor ( $NA_K = 0,65$ ),  $1/e^2$ -Laserstrahlradius vor Objektiv ( $w = 1,8\ \text{mm}$ ).

re Verbreiterung der experimentell beobachteten Maxima entsteht durch eine nicht ebene Grenzfläche (Krümmungsradius  $900\ \mu\text{m}$ ). Aufgrund der gekrümmten Oberfläche liegen verschiedene Grenzflächenorientierungen im Laserfokus vor. Die gemessenen Emissionsprofile stellen daher eine Mittelung über die leicht unterschiedlichen Emissionen an diesen Grenzflächen dar. Auch die Elliptizität des Strahlprofils (siehe Abschnitt 2.1) führt zu einer geringen Abweichung von der Simulation.

Abschliessend sei angemerkt, dass die Variation der Laserpolarisation keinen mess-

baren Einfluss auf die beobachteten THG-Emissionsprofile hatte [54]. Wie im Anhang A.1 gezeigt, kann unter Annahme der vorliegenden moderaten Fokussierung die Laserfeldstärke als rotationssymmetrisch um die optische Achse angenommen werden. Dadurch lässt sich der Azimutwinkel  $\varphi$  einer Grenzflächenorientierung durch eine Rotation des Koordinatensystems kompensieren (siehe Abbildung 3.27). Das winkelaufgelöste Intensitätsprofil hängt somit nur von dem effektiven Azimutwinkel  $\Phi - \varphi$  zwischen der Beobachtungsrichtung  $\Phi$  und der Grenzflächenorientierung  $\varphi$  ab. Dies führt zum Mitdrehen des Emissionsprofils der frequenzkonvertierten Strahlung bei einer Rotation der Grenzfläche um die optische Achse.

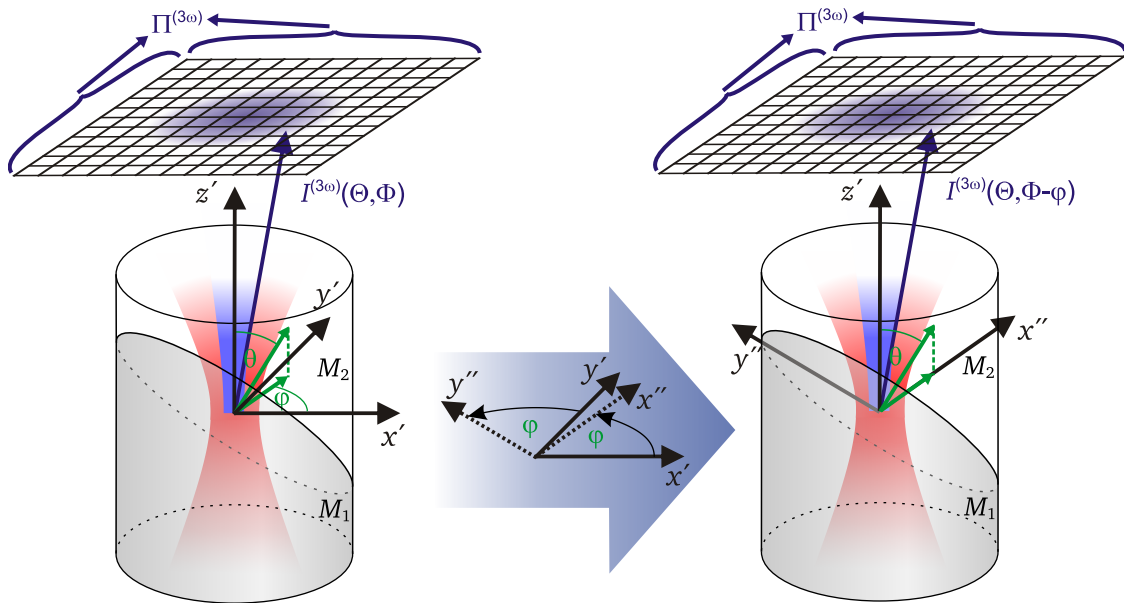


Abbildung 3.27: Kompensation des Azimutwinkels  $\varphi$  der Grenzflächenorientierung durch Rotation des Koordinatensystems um  $\varphi$ .

Die beobachteten Abhängigkeiten der THG-Emission von der Orientierung der Oberfläche im Raum ermöglichen weitere, interessante Anwendungen. So könnte die Intensitätsverteilung zwischen den beiden Maxima, sowie die Orientierung der Verbindungsline der Maxima genutzt werden, um die Oberflächenorientierung einer Probe zu bestimmen. Dies benötigt die Messung des THG-Emissionsprofils an lediglich einem einzigen Punkt der Oberfläche. Zudem wird dadurch die Bestimmung der Orientierungen von Grenzflächen mit sehr kleinen Ausdehnungen in der Größenordnung der Strahltaile ermöglicht. Die Orientierung solch kleiner Strukturen sind nicht über die Messung mehrerer Positionen möglich.

Zusammenfassend konnte der Einfluss der Grenzflächenorientierung und der Laserpolarisation auf die THG-Emission systematisch untersucht werden. Dazu wurde eine Quarzglaskapillare in einem Fluid mit angepassten Brechungsindex durch die THM abgebildet. Diese transparente Probe ohne Brechungsindexvariation ist für die Methoden der linearen Optik vollständig unsichtbar. Die Unter-

suchungen zeigten eine bessere Auflösung und höhere Konversionseffizienz der SHM und THM für longitudinal verlaufende Grenzflächen gegenüber transversal verlaufenden Grenzflächen bedingt durch die Geometrie des Laserfokus. Dadurch wird eine einfache Vermessung des Laserfokus ermöglicht.

Während die Orientierung der Laserpolarisation keinen messbaren Einfluss auf die THG-Emission zeigte, wurde eine deutliche Variation der SHG-Emission erreicht. Darüberhinaus wurden die Intensitätsprofile der THG-Emission in Abhängigkeit der Oberflächenorientierung systematisch untersucht. Hierbei wurden charakteristische Emissionsprofile beobachtet, die Rückschlüsse auf die Grenzflächenorientierung erlauben. Für Grenzflächen, die nahezu parallel zur optischen Achse sind, entstehen zwei ausgeprägte Intensitätsmaxima mit großem Divergenzwinkel zur optischen Achse. Dieses Emissionsprofil unterscheidet sich somit sehr deutlich vom Gauß-förmigen Emissionsprofil der fundamentalen Strahlung. Entgegen der in der Literatur etablierten Meinung bedarf es zu deren Detektion ausreichend großer, numerischer Aperturen. Die nicht-Gauß-förmigen THG-Emissionsprofile können sich in multifokalen Anordnungen zur mikroskopischen Abbildung beliebig orientierter Grenzflächen störend auswirken und müssen beim Design solcher Ansätze sorgfältig berücksichtigt werden.



## Kapitel 4

### Anwendungen der THM in der Mikrofluidik

Die THM wird bereits in der Biologie [3, 9, 41], der Materialwissenschaft [12, 13] und der Chemie [10, 11] erfolgreich angewandt. In den im Folgenden vorgestellten Experimenten soll die THM auf das Forschungsfeld der Mikrofluidik übertragen werden. Dieses vergleichsweise junge Forschungsgebiet beschäftigt sich mit dem Verhalten von Fluiden (vornehmlich Flüssigkeiten, seltener auch Gase) bei kleinen Volumina im Sub-Millimeter-Bereich. In diesen Mikro-Dimensionen überwiegen Diffusion und Kapillarkräfte gegenüber Turbulenzen und Gravitation [69]. Aufgrund des hohen Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisses erhöht sich die Geschwindigkeit biologischer Prozesse und chemischer Reaktionen. Daher brachte das Gebiet der Mikrofluidik innerhalb kurzer Zeit viele attraktive Anwendungen in der analytischen Chemie [70], Biotechnologie [71], Pharmazie [72–74] und chemischen Synthese [75, 76] hervor. Um beispielsweise in der pharmazeutischen Forschung spezifische medikamentöse Auswirkungen identifizieren zu können, müssen die biologische Signalübertragungswege und Protein-Protein-Interaktionen einzelner Zellen verstanden werden. Zur Quantifizierung der Bestandteile einzelner Zellen ist der Nachweis kleinster Proteinmengen und verwandter Moleküle notwendig. Im Gegensatz zu herkömmlichen Methoden, die mit großen Zellpopulationen durchgeführt werden, vermeiden mikrofluidische Ansätze einen Informationsverlust durch Ensemble-Mittelungen und einen Bedarf großer Zellmengen [72, 73]. Huang et al. entwickelten diesbezüglich ein mikrofluidisches System zur sukzessiven Zellmanipulation, Zellauflösung, Molekülmarkierung, Molekültrennung und Quantifizierung der Proteinanteile einzelner Zellen mittels der Einzelmolekül-Fluoreszenzdetektion [74]. In diesem System wurde unter anderem die Anzahl adrenergischer  $\beta_2$ -Rezeptoren einer menschlichen Zelle bestimmt. Dieser Rezeptor spielt eine wichtige Rolle zur pharmakologischen Therapie zahlreicher Herz-Kreislauf- und Atemwegserkrankungen.

Die in der Mikrofluidik verwendeten Aufbauten lassen sich typischerweise soweit miniaturisieren, dass sie in einem sogenannten „lab-on-a-chip“ integriert werden können. Solche Bausteine haben aufgrund des geringen Gewichts, der kleinen Abmessungen, der einfachen Handhabung und der kosteneffizienten Massenproduktion ein großes Potenzial für kommerzielle Anwendungen. Innerhalb dieser Bausteine werden je nach Applikation Prozesse wie Mischung, Trennung, chemische Reaktion und chemische Selektion durchgeführt. Dabei können die Prozesse meist effizienter gestaltet werden als es im makroskopischen Maßstab möglich ist.

Im Folgenden wird zunächst ein kurzer Überblick über die Grundlagen der Mikrofluidik gegeben. Anschließend werden experimentelle Ergebnisse präsentiert, die erstmals die Anwendung der THM in der Mikrofluidik demonstrieren. In einem

ersten, anwendungsrelevanten Experiment werden zwei nicht-mischbare Fluide in einem mikrofluidischen Fluss mittels der THM abgebildet. In einem zweiten, ebenfalls anwendungsrelevanten Experiment wird ein wandnaher Mischungsprozess zweier Flüssigkeiten in einem mikrofluidischen System mit der THM untersucht.<sup>1,2</sup>

## 4.1 Anmerkungen zu relevanten Grundlagen der Mikrofluidik

In diesem Abschnitt wird ein grundlegender Überblick über die theoretische Beschreibung der für diese Arbeit relevanten Eigenschaften der Mikrofluidik gegeben. Für weitere Informationen zur Mikrofluidik sei auf die Referenzen [69, 79] verwiesen.

In der Hydrodynamik werden die mechanischen Eigenschaften pro Volumenelement definiert. Aus der Masse  $m$  ergibt sich die Dichte  $\rho$  und aus der Kraft  $\vec{F}$  folgt die Volumenkraftdichte  $\vec{f}$ . Analog zur Kinetik starrer Körper führen Kräfte auch in der Mikrofluidik zu einer Dynamik des Systems. Neben den bereits erwähnten, von außen wirkenden Kräften  $\vec{f}$  wie etwa der Gewichtskraft sind hierbei durch Oberflächenspannung  $\sigma_{ij}$  der Flüssigkeiten bedingte Kräfte  $\vec{\nabla}\sigma_{ij}$  relevant. Die Dynamik von Fluiden wird durch die Navier-Stokes-Gleichung beschrieben:

$$\rho \left( \frac{\partial \vec{u}}{\partial t} + \vec{u} \cdot \vec{\nabla} \vec{u} \right) = \vec{\nabla} \sigma_{ij} + \vec{f} = -\vec{\nabla} p + \eta \vec{\nabla}^2 \vec{u} + \vec{f}. \quad (4.1)$$

Hierbei bezeichnet  $\vec{u} = \vec{u}(\vec{r}, t)$  die Strömungsgeschwindigkeit am Ort  $\vec{r}$  zum Zeitpunkt  $t$ ,  $p$  den Druck, und  $\eta$  die Viskosität des Fluids. In dieser Gleichung wurden die von der Oberflächenspannung induzierten Kräfte durch Druckkräfte und Reibungskräfte beschrieben. In der Mikrofluidik überwiegen typischerweise die Reibungskräfte gegenüber den Trägheitskräften ( $\propto \vec{u} \cdot \vec{\nabla} \vec{u}$ ). Durch Vernachlässigung der Trägheitskräfte vereinfacht sich die Navier-Stokes-Gleichung zu

$$\rho \frac{\partial \vec{u}}{\partial t} = -\vec{\nabla} p + \eta \vec{\nabla}^2 \vec{u} + \vec{f}. \quad (4.2)$$

Die Dichte gehorcht der Kontinuitätsgleichung

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \vec{\nabla}(\rho \vec{u}) = 0. \quad (4.3)$$

Die in der Mikrofluidik typischerweise verwendeten Flüssigkeiten sind nicht komprimierbar ( $\rho(t) = \text{const}$ ). Daher ist gemäß Gleichung (4.3) bei konstanten Randbedingungen eine konstante Strömungsgeschwindigkeit  $\vec{u}$  zu erwarten.

---

<sup>1</sup>Teile der Ergebnisse dieses Kapitels sind im Rahmen der Masterarbeit von Andreas Büchel entstanden, die vom Autor mit betreut wurde [77, 78].

<sup>2</sup>Teile der Ergebnisse dieses Kapitels sind in Kooperation mit Dr. Steffen Hardt (TU Darmstadt, Institut für Nano- und Mikrofluidik) entstanden.

Mit Hilfe der Gleichungen (4.1) und (4.3) lassen sich Strömungsgeschwindigkeiten numerisch sowie teilweise auch analytisch berechnen. Mittels einiger dimensionsloser Kenngrößen können Strömungen auch ohne Auswertung dieser Gleichungen in ihren Grundzügen charakterisiert werden. Die im Rahmen dieser Arbeit relevanten Kenngrößen sind die Reynolds-Zahl  $Re$  sowie die Péclet-Zahl  $Pe$ . Die Reynolds-Zahl  $Re$  ist definiert als Verhältnis der Trägheitskraft  $\vec{f}_t \propto \rho U_0^2/L_0$  zur Viskositätskraft  $\vec{f}_v \propto \eta U_0/L_0^2$

$$Re = \frac{\vec{f}_t}{\vec{f}_v} = \frac{\rho U_0 L_0}{\eta} \quad (4.4)$$

mit der charakteristischen Strömungsgeschwindigkeit  $U_0$  und der typischen Ausdehnung  $L_0$ . Erweitert man die Definition der Reynolds-Zahl mit  $L_0^2 U_0$ , wird die physikalische Bedeutung klar:

$$Re = \frac{\rho L_0^3 U_0^2}{\eta L_0^2 U_0} = \frac{2E_{kin}}{W_{Reibung}}. \quad (4.5)$$

Die Reynolds-Zahl gibt das Verhältnis der doppelten kinetischen Energie eines Flüssigkeitsvolumens  $L_0^3$  zu dessen Reibungsenergie an. Wie bereits oben erwähnt, sind in mikrofluidischen Systemen die Trägheitskräfte klein verglichen mit den Viskositätskräften. Daher strömt bei geringen Reynolds-Zahlen die Flüssigkeit laminar. Innerhalb solcher Strömungen findet die Durchmischung zweier mischbarer Flüssigkeiten nahezu ausschließlich durch Diffusion statt. Konvektion kann hier vernachlässigt werden. Als Maß für die Diffusion in einer mikrofluidischen Anwendung wird die Péclet-Zahl  $Pe$  verwendet

$$Pe = \frac{U_0 L_0}{D} \propto \frac{Y}{B}. \quad (4.6)$$

Hierbei bezeichnet  $D$  die Diffusionskonstante. Die Péclet-Zahl ist invers proportional zum Verhältnis der Kanalbreite  $B$  zur Kanallänge  $Y \propto U_0 B^2/D$ , die zur Ausbreitung des durchmischten Bereichs  $b$  über die komplette Kanalbreite  $B$  im Fluss zurückgelegt wurde. Eine genaue Definition von  $b$  erfolgt in Gleichung (4.9).

Die Diffusion basiert auf der ungerichteten Zufallsbewegung (Brown'sche Bewegung) der Flüssigkeitsmoleküle aufgrund ihrer thermischen Energie. Hierbei kommt es durch einen Konzentrationsunterschied  $\vec{\nabla}c$  zu einem Netto-Transport  $\vec{j}$  der Moleküle, der diesem Gradienten entgegenwirkt. Dieser Prozess wird durch das erste Fick'sche Gesetz beschrieben

$$\vec{j} = -D \vec{\nabla}c. \quad (4.7)$$

Setzt man diese Beziehung in die Kontinuitätsgleichung (4.3) mit der Identität der Stromdichte  $\vec{j} = \rho \vec{u}$  ein, so erhält man das zweite Fick'sche Gesetz

$$\frac{\partial c}{\partial t} + \vec{\nabla}(-D \vec{\nabla}c) = \frac{\partial c}{\partial t} - D \Delta c = 0. \quad (4.8)$$

Diese Differentialgleichung stellt eine Beziehung zwischen den räumlichen und den zeitlichen Konzentrationsunterschieden her. Die Lösung der Differentialgleichung hängt von den vorliegenden Randbedingungen ab. Betrachtet man die Mischung zweier nebeneinander fließender Flüssigkeiten in einem breiten mikrofluidischen Kanal, so lässt sich Gleichung (4.8) auf eine räumliche Dimension senkrecht zur Fließrichtung vereinfachen. Die Diffusion beginnt hier am Erstkontaktpunkt der Flüssigkeiten und weist dort ein stufenförmiges Konzentrationsprofil auf mit

$$c(x < x_c, t = 0) = c_0 \quad \text{und} \quad c(x \geq x_c, t = 0) = 0.$$

Hierbei bezeichnet  $c_0$  die Konzentration der reinen Flüssigkeit und  $x_c$  das Symmetriezentrum des Profils. Für diese Anfangsbedingungen ergibt sich die Lösung der Differentialgleichung (4.8) zu [80]

$$c(x, t) = \frac{c_0}{2} \left[ 1 - \operatorname{erf} \left( \frac{-(x - x_c)}{2\sqrt{Dt}} \right) \right]. \quad (4.9)$$

Die Funktion  $\sqrt{Dt} = b$  beschreibt die Breite  $b$  des durchmischten Bereichs. Abbildung 4.1 zeigt die nach Gleichung (4.9) berechneten Konzentrationsprofile zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Man erkennt zu Beginn des Prozesses ( $t=0$ ) den Sprung in der Konzentrationsverteilung. Durch die Diffusionsstromdichte wird dieser Gradient mit zunehmender Diffusionszeit abgebaut und geht für große Zeiten  $t \rightarrow \infty$  in eine Gleichverteilung mit  $c(t \rightarrow \infty) = c_0/2$  über.

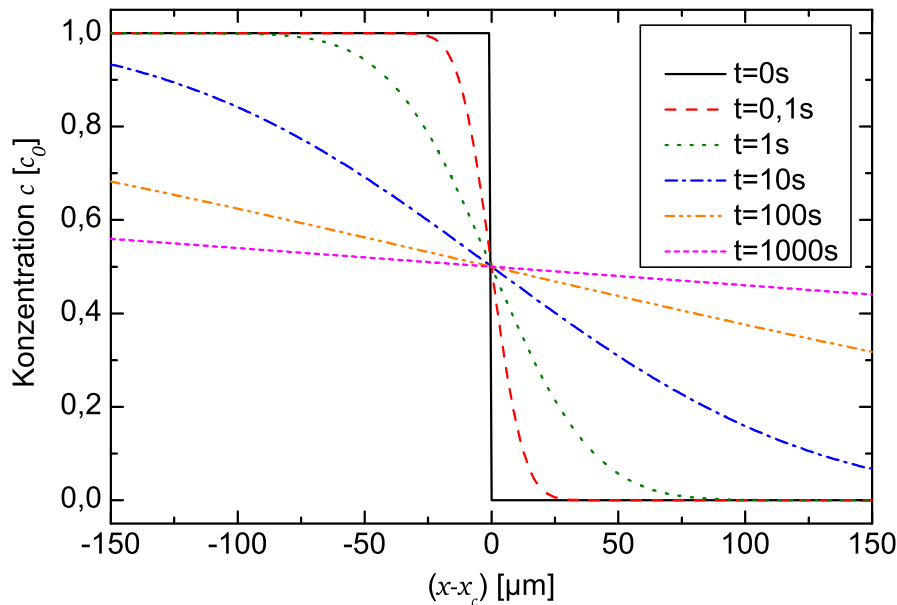


Abbildung 4.1: Simuliertes Konzentrationsprofil  $c(x, t)$  einer eindimensionalen, stufenförmigen Startkonzentration nach unterschiedlich langen Diffusionszeiten  $t$ . Die Simulation erfolgte nach Gleichung (4.9) mit einer für Flüssigkeiten typischen Diffusionskonstanten von  $D = 500 \mu\text{m}^2/\text{s}$ .

## 4.2 Experimentelle Untersuchung nicht-mischbarer Fluide mittels THM

Zur Abbildung mikrofluidischer Systeme wird typischerweise die konfokale Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Hierbei werden Farbstoffmoleküle in die Probe eingebracht und durch Absorption ein oder mehrerer Photonen eines fokussierten Ultra-Kurzpuls-Lasers angeregt. Die nach Anregung emittierte Fluoreszenz wird detektiert und zur Untersuchung der Probe benutzt. Die Strahlung ist ungerichtet und inkohärent. Der Laserfokus wird durch die Probe bewegt, um eine drei-dimensionale Abbildung zu erreichen. Als Beispiel für die Verwendung des Mikroskopieverfahrens in der Mikrofluidik an der TU Darmstadt seien die Untersuchungen von Hahn und Hardt erwähnt, welche die Separation von DNA in einem wässrigen Zwei-Phasensystem beobachteten [81]. Zur Visualisierung der DNA wurde diese mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen und mit der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie detektiert. Im Experiment wurde die DNA einer wässrigen Dextran-Lösung beigelegt und durch einen mikrofluidischen Kanal gepumpt. Die benachbarten Phasen im Kanal bilden jeweils eine wässrige Polyethylenglycol-Lösung (PEG). Abbildung 4.2 zeigt den verwendeten Aufbau. Die an der Phasengrenze akkumulierte DNA konnte, durch Variation eines homogenen elektrischen Feldes senkrecht zur Phasengrenze, gröÙenselektiv in die PEG-Phase transportiert werden.

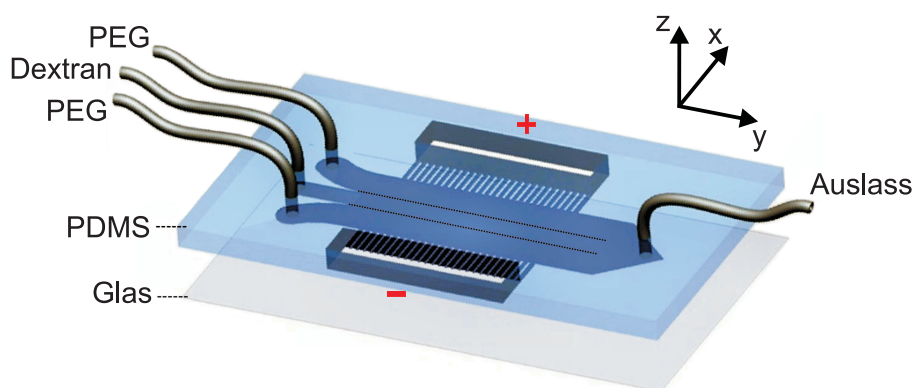


Abbildung 4.2: Aufbau des verwendeten mikrofluidischen Systems zur großenselektiven Trennung der DNA nach [82]. Die DNA ist zu Beginn in der Dextran-Phase gelöst. Quer zur Fließrichtung kann ein homogenes elektrisches Feld angelegt werden. Bei dem mikrofluidischen Kanal handelt es sich um eine in Polydimethylsiloxan (PDMS) eingebettete, etwa  $50\text{ }\mu\text{m}$  starke Vertiefung, die mit einer gläsernen Bodenplatte versiegelt ist [82].

Nachteile der Fluoreszenzmikroskopie sind zum einen, dass nur markierte Stoffe detektiert werden. Zum anderen, dass das Markieren von Molekülen mit Fluoreszenzfarbstoffen das System und dessen Eigenschaften verändern kann [83]. Die THM bietet sich hier als eine markierungsfreie Alternative zur Fluoreszenzmikroskopie an. Daher soll die THM zur Abbildung des in [81] und oben beschriebenen mikrofluidischen Systems eingesetzt werden.

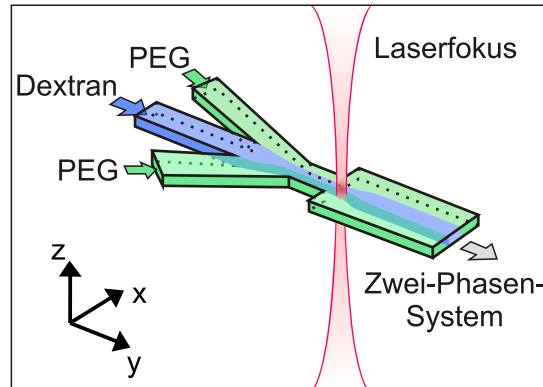


Abbildung 4.3: Aufbau zur Untersuchung eines mikrofluidischen Zwei-Phasen-Systems mit der THM. PEG wird über die beiden äußeren Einlasskanäle und Dextran über den zentralen Einlasskanal in das System gepumpt. Dazu werden drei Spritzenpumpen (New Era Pump Systems, NE-500) verwendet. Die Einlasskanäle haben eine Breite von  $60\text{ }\mu\text{m}$ . Die Engstelle ist  $130\text{ }\mu\text{m}$  und der Hauptkanal  $400\text{ }\mu\text{m}$  breit. Alle Kanäle weisen eine Höhe von  $50\text{ }\mu\text{m}$  auf und sind in ein PDMS-Substrat eingebettet. Das PDMS-Substrat ist mit einem gläsernen Deckgläschen versiegelt. Die Fließrichtung ist entlang der  $y$ -Achse und die Propagationsrichtung des Lasers entlang der  $z$ -Achse.

Zur Durchführung des Experiments werden die Flüssigkeiten durch Überdruck in den mikrofluidischen Kanal befördert und in Richtung der  $y$ -Achse durch die Kanäle bewegt (siehe Abbildung 4.3). Die drei Fluidströme der Einlasskanäle vereinigen sich in einem Hauptkanal und verlassen am Ende des Hauptkanals das System durch einen Auslass. Dieses mikrofluidische System wird als Probe so im nicht-linear optischen Mikroskop orientiert, dass der Laser (bzw. die optische Achse) senkrecht zur Bodenplatte des mikrofluidischen Systems propagiert.

Abbildung 4.4 zeigt die gemessene THM-Aufnahme eines  $xy$ -Schnitts bei halber Kanalhöhe. Alle Grenzflächen heben sich durch eine erhöhte Intensität der frequenzverdreiften Strahlung deutlich vom Untergrund ab. Von links nach rechts sind die Außenwände der Einlasskanäle, des verjüngten Bereichs des Hauptkanals sowie des breiten Bereichs des Hauptkanals deutlich sichtbar. Die Phasengrenzen zwischen den Flüssigkeiten sind ebenfalls klar zu erkennen. Entsprechend ihrer identischen Volumenströme von  $Q_{\text{PEG},1} = Q_{\text{Dex}} = Q_{\text{PEG},2} = 1,05\text{ }\mu\text{l}/\text{min}$  bilden sich drei Ströme gleicher Breite aus. Die geringe Schwankung der Phasengrenze ist auf die limitierte Genauigkeit der Volumenströme während der Messung zurückzuführen.

Abbildung 4.5 zeigt einen  $xz$ -Schnitt senkrecht zur Fließrichtung im Bereich des verjüngten Hauptkanals. In dem betrachteten Schnitt fließen die Flüssigkeiten aus der Blattebene heraus. Entlang der  $x$ -Achse stellt sich die Grenzfläche zwischen dem PDMS-Substrat und der Glasplatte durch ein hohes Signal dar. Parallel dazu bei etwa  $z = 50\text{ }\mu\text{m}$  erstreckt sich die Kanaldecke, welche über die dazu senkrechten Kanalwände bei  $x = -70\text{ }\mu\text{m}$  und  $x = 60\text{ }\mu\text{m}$  mit dem Kanalboden verbunden sind. Innerhalb des rechteckigen Kanalprofils fließen die Fluide. Auch hier sind die Phasengrenzen zwischen den jeweiligen sich nicht-mischenden Fluiden sicht-

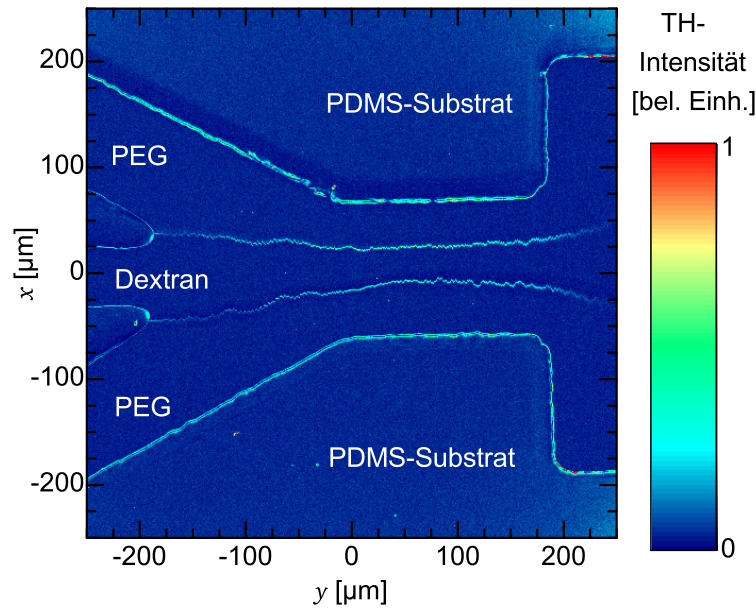


Abbildung 4.4: THM-Aufnahme der  $xy$ -Ebene des mikrofluidischen Systems nach Abbildung 4.2 mit drei transparenten Fluidströmen (PEG, Dextran und PEG), die entlang der  $y$ -Achse fließen. Die räumliche Auflösung dieser Messung beträgt  $1\,\mu\text{m} \times 1\,\mu\text{m}$ . Die Volumenströme in den drei Einlasskanälen beträgt jeweils  $Q_{\text{PEG},1} = Q_{\text{Dex}} = Q_{\text{PEG},2} = 1,05\,\mu\text{l}/\text{min}$ . Es bildet sich ein stationäres Strömungsbild aus. Die Abbildung kann mit der Lichtmikroskopaufnahme in Abbildung 2.10 auf Seite 32 verglichen werden. Parameter der Messung: Objektiv ( $10\times$  /  $NA_F = 0,22$ ), Chopperfrequenz ( $50\,\text{kHz}$ ), mittlere Laserleistung ( $0,33\,\text{W}$ ), THG-PMT-Spannung ( $0,75\,\text{kV}$ ), Lock-In-Einstellungen (Eingangsverstärkung (5), Ausgangsverstärkung (150), Integrationszeit ( $3\,\text{ms}$ ), Zeitkonstante ( $500\,\mu\text{s}$ ), Filter-Ordnung (1)).

bar. Die Phasengrenze zeigt eine leichte Krümmung, die sich durch Oberflächenspannungen und limitierte Genauigkeit der Volumenströme während der Messung ergeben. Die Breite der einzelnen Fluidphasen skaliert mit den verwendeten Volumenströmen von  $Q_{\text{PEG},1} = Q_{\text{PEG},2} = 10\,\mu\text{l}/\text{min}$  in den äußeren und  $Q_{\text{Dex}} = 1\,\mu\text{l}/\text{min}$  in der inneren Phase. Unter- und oberhalb von longitudinal verlaufenden Grenzflächen sind Grenzflächen teilweise nicht erkennbar. Zwar sind die Brechungsindizes der Fluide sehr ähnlich ( $n_{D,\text{Fluid}} \approx 1,33$  [78,84–86]), jedoch unterscheiden sich diese leicht vom Brechungsindex des PDMS-Substrats ( $n_{D,\text{PDMS}} \approx 1,4$  [87]). An longitudinal verlaufenden Grenzflächen (nahezu paralleler Lichteinfall) führt dieser Unterschied zu nicht vernachlässigbaren Brechungen und Reflexionen. Dadurch ergibt sich sowohl eine „Abschattung“ der am Kanalboden konvertierten Strahlung als auch eine „Abschattung“ der Laserstrahlung an der Kanaldecke durch die longitudinal verlaufende Kanalwand. Die Kanalwand selbst führt aufgrund ihrer longitudinalen Orientierung zu einer höheren Konversionseffizienz und ist aufgrund des THG-Emissionsprofils in Form zweier Maxima hoher Divergenz weniger von der „Abschattung“ betroffen (Siehe Kapitel 3.2.2). Ferner wirken sich die Orientierungen der verschiedenen Grenzflächen im mikrofluidischen System auf die an den Grenzflächen emittierte THG-Gesamtintensität aus. Während die longitudinal verlaufenden Grenzflächen sehr scharfe Maxima aufweisen, zeigen die trans-



versal verlaufenden Grenzflächen breite Verläufe der Maxima. Wie in Abschnitt 3.2.1 geschildert, ist dies durch das Aspektverhältnis des Fokusvolumens bedingt. Die geeignet gewählte Probenorientierung ermöglicht daher die Auflösung der nur  $10\text{ }\mu\text{m}$  voneinander entfernten Phasengrenzen.

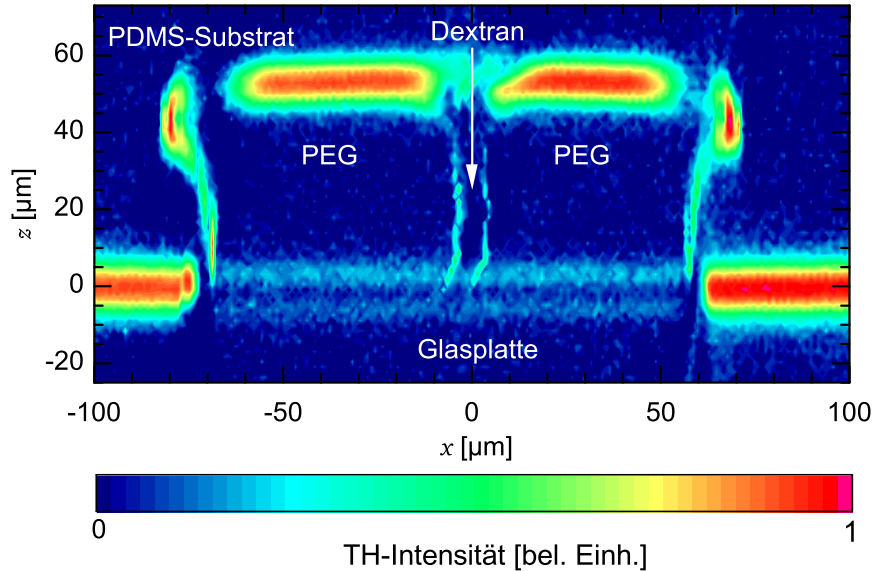


Abbildung 4.5: THM-Aufnahme der  $xz$ -Ebene eines mikrofluidischen Systems mit drei transparenten Fluidströmen (PEG, Dextran und PEG), die entlang der  $y$ -Achse fließen (nach [57]). Die räumliche Auflösung dieser Messung beträgt  $1 \times 1\text{ }\mu\text{m}$ . Die Unterbelichtung der Ecken des Kanals ist auf Abschattung durch die an den senkrechten Grenzflächen stattfindende, partielle Brechung zurückzuführen. Die Volumenströme in den beiden äußeren PEG-Einlasskanälen beträgt jeweils  $Q_{\text{PEG},1} = Q_{\text{PEG},2} = 10\text{ }\mu\text{l/min}$ , im inneren Dextran-Einlasskanal  $Q_{\text{Dex}} = 1\text{ }\mu\text{l/min}$ . Durch die konstanten Volumenströme bildet sich ein stationäres Strömungsbild. Parameter der Messung: Objektiv ( $20\times$  /  $NA_F = 0,4$ ), Chopperfrequenz ( $50\text{ kHz}$ ), mittlere Laserleistung ( $0,33\text{ W}$ ), THG-PMT-Spannung ( $0,75\text{ kV}$ ), Lock-In-Einstellungen (Eingangsverstärkung (5), Ausgangsverstärkung (150), Integrationszeit ( $3\text{ ms}$ ), Zeitkonstante ( $500\text{ }\mu\text{s}$ ), Filter-Ordnung (1)).

Die Messungen demonstrieren klar die Möglichkeiten der THM zur Abbildung mikrofluidischer Systemen fester Phasengrenzen. Hierbei zeichnet sich die THM gegenüber der typischerweise verwendeten Fluoreszenzmikroskopie dadurch aus, dass keine Marker bzw. Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden, die das System stören können [83]. Da es sich bei der genutzten Erzeugung harmonischer Frequenzen um einen nicht-resonanten Prozess ohne Energieübertragung an die Probe handelt, erlaubt die THM auch die Untersuchung temperaturempfindlicher Proben. Zudem stellt die THM im Gegensatz zur Fluoreszenzmikroskopie, die lediglich die mit Markern versehenen Bereiche visualisiert, alle Grenzflächen des Systems simultan dar.

Es sei angemerkt, dass aufgrund der Isotropie aller beteiligten Medien hier keine messbare Frequenzverdopplung stattfindet. Die in diesem Experiment nicht auftretende SGH-Emission kann in mikrofluidischen Proben mit eingebrachten, festen Partikeln zur Abbildung der festen Stoffe genutzt werden um beispielsweise



Strömungsfelder zu vermessen [4, 43, 88, 89].

### 4.3 Experimentelle Untersuchung wandnaher Mischungen mittels THM

Im Gegensatz zu nicht-mischbaren Flüssigkeiten (wie z.B. in Abbildung 4.5 oben gezeigt) besitzen mischbare Flüssigkeiten keine festen Phasengrenzen, sondern graduelle Übergänge. Da die THM auf einer sprunghaften Änderung der optischen Materialeigenschaften basiert, sind graduelle Übergänge mit der THM nicht beobachtbar. Mischprozesse in einem mikrofluidischen System können dennoch mit THM sichtbar gemacht werden, wenn die Mischung wandnah erfolgt bzw. in der Nähe von Kanalwänden beobachtet wird. Zur Demonstration des Verfahrens wurde die Mischung von Ethanol und Wasser in einem mikrofluidischen Kanal mittels THM untersucht. Die beiden transparenten Flüssigkeiten besitzen sehr ähnliche Brechungsindizes von  $n_{\text{Ethanol}} = 1,36$  und  $n_{\text{Wasser}} = 1,33$  bei 810 nm und stellen daher eine schwer zugängliche Probe für die konventionelle, (linear) optische Mikroskopie dar [86, 90].

Zur THM-Abbildung von Ethanol und Wasser in der Nähe der Kanalwand wird ausgenutzt, dass die Intensität der dritten Harmonischen mit der nichtlinearen Suszeptibilität dritter Ordnung skaliert und diese wiederum von Medium zu Medium variiert. Abbildung 4.6 zeigt die gemessene, relative Intensität der frequenzverdreifachten Strahlung aufgetragen gegen die Ethanolkonzentration eines Ethanol-Wasser-Gemischs in Volumenprozent. Die dritte Harmonische wurde hierbei an einem Übergang von Quarzglas in das jeweilige Gemisch erzeugt. Die Messwerte zeigen eine zweieinhalbfache Steigerung der TH-Intensität an der Grenzfläche reinen Ethanols ( $\hat{=}$  100% Vol.) gegenüber jener an der Grenzfläche reinen Wassers ( $\hat{=}$  0% Vol.). Für beliebige Mischungsverhältnisse zeigt sich ein linearer Anstieg der detektierten Intensität mit der Ethanolkonzentration. Zur Veranschaulichung der Linearität ist eine lineare Regressionsgerade eingezeichnet. Die Linearität der TH-Intensität bezüglich der Ethanolkonzentration ermöglicht die Bestimmung von Ethanol-Konzentrationen in Wasser anhand der TH-Signalstärke.

Zur Abbildung der Mischung von Ethanol und Wasser wird ein mikrofluidisches System in einem Quarzglas-Substrat als Probe verwendet (siehe Abbildung 4.7). Durch zwei benachbarte Einlasskanäle wird Wasser mit einem Gesamtvolumenstrom von  $Q_W = 1 \mu\text{l}/\text{min}$  gepumpt, sowie Ethanol durch den dritten Einlasskanal mit einem Volumenstrom von  $Q_E = 1 \mu\text{l}/\text{min}$ . Die drei Einlasskanäle laufen zusammen und bilden einen Hauptkanal. Die Propagationsrichtung des Lasers ( $z$ -Achse) verläuft senkrecht zur Bodenplatte des Kanals. Die Fließrichtung der Fluide im Hauptkanal ist parallel zur  $y$ -Achse.

Da die mikrofluidische Strömung laminar ist und keine Turbulenzen auftreten, basiert die Mischung der Flüssigkeiten auf Diffusion. Der Mischungsprozess beginnt am Erstkontaktpunkt der Fluidströme. Während der Diffusionszeit  $t$  werden die Fluide durch den konstanten Strom um eine gewisse Strecke  $y$  fortbewegt. Dadurch ergibt sich eine räumlich und zeitlich stationäre Konzentrationsverteilung entlang der Kanäle.

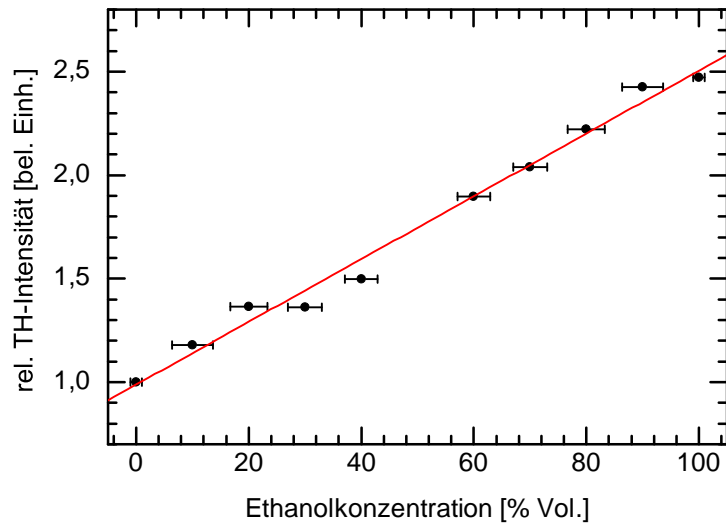


Abbildung 4.6: Gemessene, relative Intensität der dritten Harmonischen (TH) gegen die Ethanolkonzentration eines Ethanol-Wasser-Gemischs in Volumenprozent. Die rote Linie stellt eine lineare Regressionsgerade an die Messwerte dar. Die horizontalen Fehlerbalken ergeben sich durch die Unsicherheit beim Ansetzen des Gemischs. Zur Unterdrückung von Einflüssen durch veränderte Transmission und Laserschwankungen wurde die TH-Intensität der Gemisch-Quarzglas-Grenzfläche relativ zur TH-Intensität einer Quarzglas-Luft-Grenzfläche oberhalb der Probe angegeben. Parameter der Messung: Objektiv (25x /  $NA = 0,6$ ), Chopperfrequenz (50 kHz), mittlere Laserleistung (0,5 W), THG-PMT-Spannung (0,55 kV), Lock-In-Einstellungen (Eingangsverstärkung (5), Ausgangsverstärkung (150), Integrationszeit (4 ms), Zeitkonstante (2 ms), Filter-Ordnung (1)).

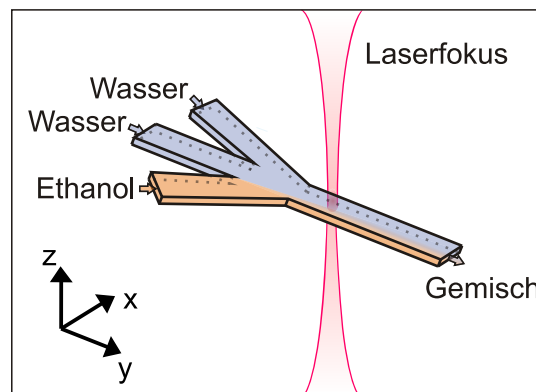


Abbildung 4.7: Aufbau zur Untersuchung der Diffusion von Ethanol und Wasser mit der THM. Ethanol wird über einen der äußeren Einlasskanäle und Wasser über die beiden verbleibenden Einlasskanäle in das System gepumpt. Dazu werden drei Spritzenpumpen (New Era Pump Systems, NE-500) mit den Spritzen (Hamilton, 1710) verwendet. Die Kanäle sind in ein Quarzglas-Substrat eingebettet und weisen eine Breite von  $300\,\mu\text{m}$  und eine Höhe von  $100\,\mu\text{m}$  auf.

Mit Hilfe der THM wird die räumliche Konzentrationsverteilung des Ethanols am Kanalboden ermittelt. Hierzu wird der Laserfokus in der  $xy$ -Ebene über den Kanalboden bewegt und dabei die emittierte Intensität der dritten Harmonischen vermessen. Die Messwerte sind jeweils um den Untergrund aus einer Referenzmessung an einem Kanal mit reinem Wasser reduziert.

In Abbildung 4.8 (a) ist die THM-Aufnahme der Mischung von Ethanol und Wasser im mikrofluidischen System zu sehen. Der  $xy$ -Schnitt zeigt den Verlauf der Diffusion im Hauptkanal ab der Vereinigung der Einlasskanäle. Die Bereiche reinen Ethanols weisen das höchste Signal auf. Im Gegensatz dazu zeigen die Bereiche reinen Wassers kein TH-Signal, aufgrund der Differenzbildung mit der Referenzmessung an reinem Wasser. Während am linken Bildrand ein abrupter Übergang von orange nach schwarz zu beobachten ist, wird dieser Übergangsbereich (blau) zum rechten Bildrand hin immer breiter. Diese Verbreiterung des Übergangsbereichs zeigt den Verlauf der Diffusion entlang des Hauptkanals. Exemplarisch sind in den Abbildungen 4.8 (a) und (b) zwei vergrößerte Ausschnitte der aufgenommenen Konzentrationsverteilung dargestellt.

Zur quantitativen Auswertung der Daten werden die Konzentrationsprofile senkrecht zur Fließrichtung betrachtet. Exemplarisch ist dazu das Konzentrationsprofil  $y = 738 \mu\text{m}$  nach dem Erstkontaktpunkt der Fluide in Abbildung 4.9 dargestellt. Die Grenzen des mikrofluidischen Kanals sind durch die beiden vertikalen, gestrichelten Linien angedeutet. Außerhalb des Mikrofluidikkanals verschwindet das Signal der frequenzverdreifachten Strahlung, da hier keine Grenzfläche existiert, mit welcher der Laserfokus überlappen könnte. Innerhalb des Kanals fällt das Signal mit zunehmender  $x$ -Position von einem hohen, konstanten Plateau monoton bis auf Null ab. Da die untergrundbereinigte Intensität der dritten Harmonischen direkt proportional zur Ethanolkonzentration ist, entspricht das Plateau dem Bereich puren Ethanols. Die Datenpunkte im Bereich der rechten Kanalwand liegen nahe Null und repräsentieren den Bereich puren Wassers. Die Übergangsbreite  $b$  des blau schattierten Gradienten in der Mitte beschreibt den Fortschritt der Diffusion. Die Breite  $b$  wird durch Anpassung des nach Abschnitt 4.1 zu erwartenden Verlaufs des Diffusionsprofils gemäß der zeitinvarianten Form von Gleichung (4.9)

$$c(x) = \frac{c_0}{2} \left[ 1 - \operatorname{erf} \left( \frac{-(x - x_c)}{2b} \right) \right] \quad (4.10)$$

an die Messwerte zu  $b = (15 \pm 2) \mu\text{m}$  bestimmt. Die Breite  $b$  ist hierbei definiert als Abstand der Punkte mit einer Amplitude von 24% und 76% der Maximalamplitude. Mittels der mittleren Fließgeschwindigkeit  $\bar{v}$  kann aus der Position  $y$  die Diffusionszeit  $t$  berechnet werden. Die Fließgeschwindigkeit ergibt sich aus dem Gesamtvolumenstrom  $Q_W + Q_E = 2 \mu\text{l/min}$  und der Kanalquerschnittsfläche  $A = 300 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$  zu

$$\bar{v} = \frac{Q_W + Q_E}{A} = 1,11 \text{ mm/s}. \quad (4.11)$$

Die Diffusionszeit  $t = y/\bar{v}$  für das in Abbildung 4.9 gezeigte exemplarische Konzentrationsprofil bei  $y = 738 \mu\text{m}$  ergibt sich damit zu 0,66 s.

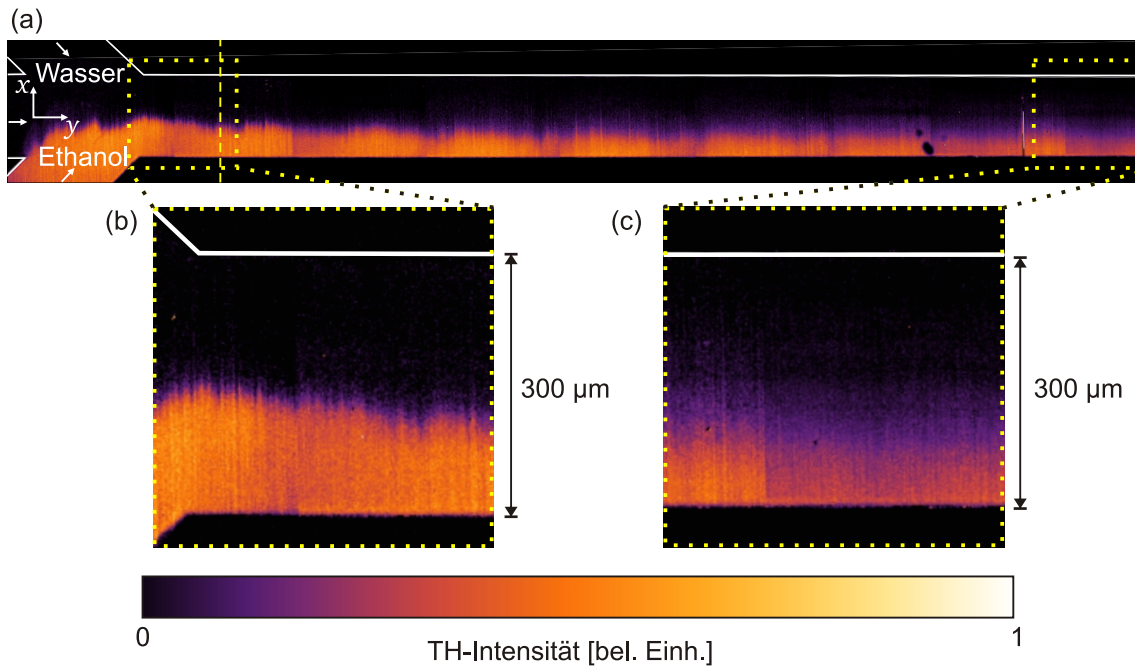


Abbildung 4.8: (a) THM der Ethanolkonzentration an der Unterseite des Mikrofluidikkanals (nach [91]). Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern, sind die Daten über jeweils drei Messungen gemittelt. Zur besseren Orientierung wurde die Kanalgeometrie durch zusätzliche weiße Linien angedeutet. Der Erstkontaktpunkt der beiden Flüssigkeiten an den Kanaleingängen wurde als Ursprung des Koordinatensystems gewählt. Die gelbe gestrichelte Linie skizziert die Position des Querschnitts der in Abbildung 4.9 dargestellt ist. Der abgebildete Bereich hat eine Ausdehnung von  $4,1\text{ mm} \times 0,5\text{ mm}$  (bzw.  $2050 \times 250$  Bildpunkte). Die Abbildung wurde aus mehreren sich überlappenden Einzelmessungen der Größe  $0,6\text{ mm} \times 0,6\text{ mm}$  zusammengesetzt. Die räumliche Auflösung beträgt  $2\text{ }\mu\text{m}$ . Die leichte Fluktuation der absoluten Position des Übergangsbereichs von Ethanol zu Wasser ist auf die leichte Diskontinuität der Flussrate zurückzuführen. Die Fluktuationen haben keine signifikanten Auswirkungen auf die Bestimmung der Übergangsbreite oder des Diffusionskoeffizienten. Die zwei unterbelichteten Bereiche am Ende des Auslasskanals wurden durch Oberflächenschäden der Kanalunterseite verursacht. Zudem ist am rechten Bildrand eine Überbelichtung (vertikale weiße Linie) zu beobachten, vermutlich aufgrund einer durchströmenden Luftblase. Diese lokalen Störungen werden für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt. Parameter der Messung: Objektiv ( $10\times / NA_F = 0,22$ ), Chopperfrequenz ( $75\text{ kHz}$ ), mittlere Laserleistung ( $0,5\text{ W}$ ), THG-PMT-Spannung ( $0,75\text{ kV}$ ), Lock-In-Einstellungen (Eingangsverstärkung (5), Ausgangsverstärkung (90), Integrationszeit ( $2\text{ ms}$ ), Zeitkonstante ( $500\text{ }\mu\text{s}$ ), Filter-Ordnung (1)). (b) & (c) Vergrößerte Darstellungen der beiden Bereiche innerhalb der gelb gepunkteten Quadrate.

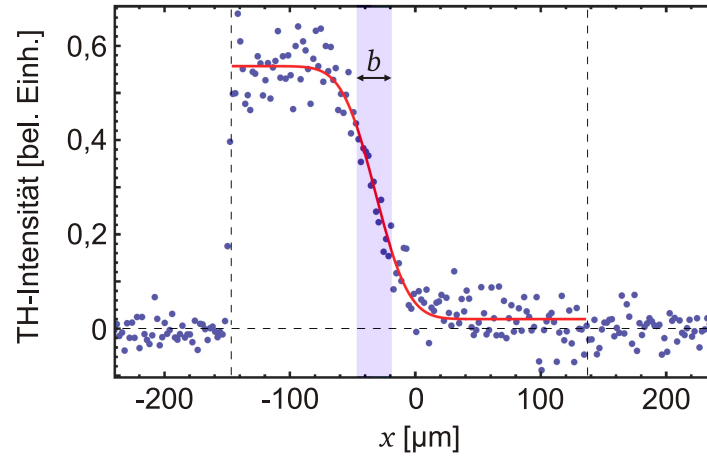


Abbildung 4.9: Untergrundbereinigte TH-Intensität entlang eines Kanalquerschnitts an der Position  $y = 738 \mu\text{m}$  (siehe gelb gestrichelte Linie in Abbildung 4.8). Die TH-Intensität ist nach Untergrundbereinigung direkt proportional zur Ethanolkonzentration. Die gestrichelten Linien deuten die Ränder des Mikrofluidikkanals an. Die blauen Punkte zeigen die gemessenen Daten. Die rote Kurve ist eine Anpassung des erwarteten Konzentrationsprofils gemäß Gleichung (4.10) an die Messwerte. Der in Blau schattierte Bereich stellt die angepasste Übergangsbreite  $b$  dar.

Zur Beschreibung der Diffusion wird die Breite  $b$  für alle Konzentrationsprofile senkrecht zur Fließrichtung bestimmt. Um statistische Schwankungen zu reduzieren, werden die ermittelten Werte für die Breite  $b$  über 300 benachbarter Konzentrationsprofile gemittelt. Bei der Mittelung werden Werte ignoriert, deren relative Unsicherheit mehr als 50% betragen, sowie Werte deren relative Abweichung vom Mittelwert größer ist als 50%. Abbildung 4.10 zeigt die ermittelten Breiten  $b$  des Diffusionsbereichs, aufgetragen gegen die verstrichene Diffusionszeit  $t = y/\bar{v}$ . Die Fehlerbalken der Datenpunkte stellen die jeweilige Standardabweichung der Mittelung dar. Wie in Abschnitt 4.1 gezeigt, ist die Breite  $b$  des Diffusionsbereichs gegeben durch

$$b(t) = \sqrt{D \cdot t} \quad (4.12)$$

mit der Diffusionskonstanten  $D$ . Eine Anpassung dieser Funktion an die Datenpunkte liefert eine Diffusionskonstante von  $(460 \pm 30) \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Dieser Wert liegt innerhalb des theoretisch vorhergesagten Bereich von  $D_{\min} = 380 \mu\text{m}^2/\text{s}$  bis  $D_{\max} = 840 \mu\text{m}^2/\text{s}$  von Zhang et al. und ist ebenfalls konsistent mit den Ergebnissen makroskopischer Experimente von Tyn und Calus [92, 93]. Zum besseren Vergleich ist der von Zhang et al. theoretisch vorhergesagte Bereich als blaue Schattierung in Abbildung 4.10 eingezeichnet. Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmte Diffusionskonstante liegt eher im unteren Bereich der theoretischen Vorhersage. Hierfür können mehrere Ursachen verantwortlich sein: Zur Vereinfachung wurde im Rahmen dieser Arbeit angenommen, dass es sich bei dem Diffusionskoeffizienten um eine Konstante handelt. Allerdings ist diese abhängig von der Konzentration der Fluide. Die Diffusionskonstante ist hierbei maximal für pure Fluide und

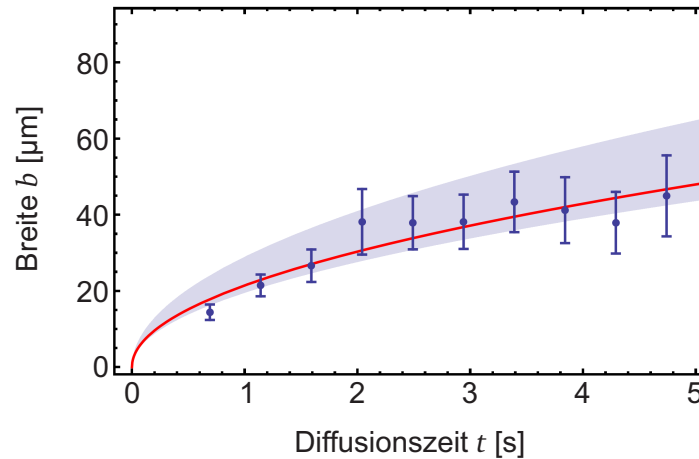


Abbildung 4.10: Entwicklung der Übergangsbreite  $b$  mit der Diffusionszeit  $t$ . Die blauen Punkte zeigen die ermittelten Daten. Die Fehlerbalken berücksichtigen die Standardabweichung der Mittelung über maximal 300 benachbarte Übergangsbreiten. Die rote Linie stellt den angepassten Verlauf der zu erwartenden Funktion  $\sqrt{D \cdot t}$  dar. Die blaue Schattierung stellt den simulierten Erwartungsbereich zwischen den berechneten minimalen und maximalen Diffusionskoeffizienten dar [92]. Der experimentell bestimmte Verlauf ist in Übereinstimmung mit dem theoretisch vorhergesagten Bereich.

minimal für nahezu gleichverteilte Konzentrationen [92, 93]. Da die hier betrachtete Diffusion bereits nach kurzer Zeit hauptsächlich im Übergangsbereich mit ähnlichen Konzentrationen der Fluide stattfindet, ist eine eher kleinere, mittlere Diffusionskonstante zu erwarten. Zusätzlich gestützt wird diese Vermutung durch eine größere, experimentell ermittelte Diffusionskonstante ( $D_{kurz} = 740 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) für sehr kurze Diffusionszeiten ( $t < 0,5 \text{ s}$ ) – also Diffusion nahezu purer Fluide. Dieser Wert wurde im Rahmen einer Masterthesis in einer weiteren Messreihe bei erhöhtem Volumenstrom bestimmt [78]. Längere Diffusionszeiten können in der verwendeten Geometrie nicht betrachtet werden, da nach einigen Sekunden der Diffusionsbereich sich über die komplette Kanalbreite ausdehnt. In diesem Fall ist die Voraussetzung konstanter Konzentrationen an den Rändern nicht mehr erfüllt und damit das zugrunde liegende Modell ungültig (vgl. Abbildung 4.1 für  $t = 1 \text{ s}$  und  $t = 10 \text{ s}$  auf Seite 74). Weiterhin wurde eine räumlich konstante, mittlere Fließgeschwindigkeit angesetzt, in einem realistischeren Modell müsste ein durch Wandreibung bedingtes parabolisches Geschwindigkeitsprofil verwendet werden. Die Ergebnisse dieses Abschnitts stimmen trotz des zugrunde liegenden, einfachen Modells mit den theoretischen und experimentellen Erwartungswerten der Literatur überein. Damit konnten die Möglichkeiten der THM zur Bestimmung oberflächennaher, zweidimensionaler Konzentrationsverteilungen erfolgreich demonstriert werden. Besonders hervorzuheben ist dabei, dass dazu kein besonderer Aufbau notwendig ist, sondern in einem unveränderten Mikrofluidikkanal gemessen werden kann. Somit lässt sich dieses Verfahren auch auf viele weitere Systeme, wie beispielsweise zur Visualisierung der Kinetik chemischer Reaktionen übertragen [94, 95]. Zudem wurde in zwei im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Masterarbeiten eine schwache Abhängigkeit der Frequenzkonversion von der

Temperatur nachgewiesen [54, 77, 78]. Dies eröffnet die Möglichkeit auch wandnahe Wärmetransportprozesse mit der THM zu untersuchen [94, 96–98].

Zusammenfassend wurde die THM erfolgreich zur Untersuchung mikrofluidischer Systeme angewandt. Die THM ermöglicht eine hochauflösende, dreidimensionale Visualisierung transparenter Proben mit homogenen Brechungsindex. Im Gegensatz zu alternativen Mikroskopie-Verfahren werden bei der THM die Proben weder durch Marker, Farbstoffe oder Energieeinträge gestört. Neben festen Phasengrenzen sind mit der THM sogar wandnahe Konzentrationen und Temperaturen berührungslos nachweisbar. Hierbei wurden sowohl mikrofluidische Systeme nicht-mischbarer als auch mischbarer Fluide erfolgreich untersucht.

Bisher wurden aufgrund der benötigten Aufnahmedauer statische Systeme betrachtet. Durch technische Erweiterungen wie der Einzelphotonendetektion [99], der resonanten Bewegung des Galvo-Scanners [45, 99] und multifokaler Ansätze [67] können THM-Aufnahmen in Videogeschwindigkeit durchgeführt werden, um so auch dynamische Prozesse in der Mikrofluidik zu untersuchen. Zudem können Ansätze basierend auf der chromatischen Aberration und spektralaufgelösten Detektion als alternative Tiefenauflösung [40] oder Verwendung komplexer Polarisationszustände zur Optimierung der transversalen Auflösung [100, 101] zusätzlich das Potenzial der nichtlinear optischen Mikroskopie für zukünftige Anwendungen steigern.

## Zusammenfassung und Ausblick

### Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Mikroskop basierend auf der Frequenzverdopplung (SHG) und der Frequenzverdreifachung (THG) zur dreidimensionalen Visualisierung transparenter Proben aufgebaut. An diesem nichtlinear optischen Mikroskop wurde die Abhängigkeit der räumlichen Auflösung, der Konversionseffizienz und des transversalen Emissionsprofils von der Grenzflächenorientierung einer heterogenen Probe untersucht. Darüber hinaus wurde die THG-Mikroskopie erstmals auf das Forschungsgebiet der Mikrofluidik übertragen.

Der Einfluss der Grenzflächenorientierung auf die Emission der SHG und THG wurde an einer Quarzglas Kapillare in einem brechungsindexangepassten Immersionsöl systematisch untersucht. Die dreidimensionalen Aufnahmen bzw. zweidimensionalen Schnitte der SHG-Mikroskopie (SHM) und der THG-Mikroskopie (THM) zeigten, dass die Richtung der Laserpolarisation keinen Einfluss auf die Konversionseffizienz und die räumliche Auflösung der THM-Aufnahme hat. Dies widerspricht früheren numerischen Simulationen, stimmt allerdings gut mit dem intuitiven Ansatz der Frequenzverdreifachung in isotropen Medien überein. Im Gegensatz dazu führt die Rotation der Laserpolarisation in der SHM zu einer großen Modulation der Signalstärke. Dies ist auf eine Anisotropie der schwachen Suszeptibilität zweiter Ordnung in Quarzglas zurückzuführen.

Die Grenzflächenneigung bezüglich der Strahlachse beeinflusst die Signalstärke und die räumliche Auflösung, sowohl in der SHM wie auch in der THM. Im Gegensatz zu früheren, numerischen Simulationen ist die Intensität der zweiten und dritten Harmonischen an Grenzflächen parallel zur optischen Achse höher als an Grenzflächen orthogonal dazu. Dies korreliert mit der Größe der geometrischen Schnittfläche von Laserfokus und Grenzschicht. In der nichtlinear optischen Mikroskopie ermöglicht eine geschickte Wahl der Probenorientierung die Optimierung der räumlichen Auflösung und des Signal-Rausch-Verhältnisses.

Erstmals wurde das räumliche Emissionsprofil der dritten Harmonischen bei unterschiedlichen Grenzflächenorientierungen vermessen. Hierbei zeigte sich, dass nur an Grenzflächen senkrecht zur Strahlrichtung die erzeugte dritte Harmonische ein Gauß-Profil mit einem intensiven Maximum in Vorwärtsrichtung aufweist. Lediglich in dieser Geometrie beträgt der Durchmesser der dritten Harmonischen etwa  $1/\sqrt{3}$  des Durchmessers des Laserprofils. Dieses Verhältnis deckt sich mit intuitiven, theoretischen Ansätzen der Frequenzverdreifachung. Wird die



Grenzflächenneigung bezüglich der optischen Achse variiert, so ändert sich auch das Emissionsprofil der dritten Harmonischen signifikant. Mit Verringerung des Schnittwinkels zwischen der Grenzfläche und der Strahlachse entfernt sich das Maximum des THG-Emissionsprofils von der optischen Achse. Für nahezu longitudinal verlaufende Grenzflächen entsteht gegenüber dem Maximum ein zweites zunächst schwächeres Maximum. Die Intensität der beiden Maxima erreicht bei einer perfekt longitudinal verlaufenden Grenzfläche gleiche Werte. In diesem Fall liegen die beiden Maxima auf einem Emissionskegel, dessen Öffnungswinkel größer ist als jener des fokussierenden Objektivs. Das Emissionsprofil dreht sich bei Rotation der Grenzfläche um die optische Achse mit. Die Emissionsprofile bestätigen sowohl frühere, numerische Simulationen als auch die im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Simulationen. Als wichtige Konsequenzen für die THM erfordert die Signalerfassung für moderate Fokussierungen eine numerische Detektionsapertur (entgegen der bislang in der Literatur vorherrschenden Meinung), die deutlich über jener des fokussierenden Objektivs liegt. Zudem ist bei multifokalen Ansätzen eine geeignete Abbildung auf den ortsauflösenden Detektor zu verwenden. Die Ablenkung des Intensitätsmaximums sowie das Intensitätsverhältnis der Maxima des Emissionsprofils der dritten Harmonischen eröffnet die Möglichkeit die Orientierung einer mikroskopischen Grenzfläche festzustellen, ohne dabei ein vollständiges dreidimensionales Bild aufnehmen zu müssen.

Die Methode der THM wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals auf das Forschungsgebiet der Mikrofluidik übertragen. Die THM-Aufnahmen zeigten eine hochauflösende Visualisierung von Phasengrenzen nicht-mischbarer Flüssigkeiten in einem mikrofluidischen System. Verglichen mit der typischerweise verwendeten Fluoreszenzmikroskopie müssen hier keine Marker verwendet werden, die Untersuchung temperaturempfindlicher Proben ist möglich und es werden alle Grenzflächen des Systems simultan abgebildet.

In einem weiteren Experiment wurde die Ethanolkonzentration bei der Mischung von Ethanol und Wasser durch die Intensität der am Kanalboden erzeugten, frequenzverdreifachten Strahlung ermittelt. Das gemessene, zweidimensionale Profil zeigte die stationäre Konzentrationsverteilung eines fließenden, mikrofluidischen Systems. Durch die Anpassung theoretisch erwarteter Konzentrationsprofile gelang es einen Diffusionskoeffizienten von  $D = (460 \pm 30) \mu\text{m}^2/\text{s}$  zu bestimmen. Der ermittelte Koeffizient ist konsistent mit jüngsten, theoretischen Vorhersagen als auch mit früher gemessenen Werten in deutlich komplexeren Aufbauten.

Die Ergebnisse zeigen eindrucksvoll das Potential der THM. Zudem Bedarf es keinen speziellen Anpassungen der typischerweise verwendeten, mikrofluidischen Systeme. Neben der Untersuchung von Diffusionen bzw. Mischungen ist es denkbar, auch wandnahe Temperaturgradienten oder Dynamiken chemischer Reaktionen mit der THM aufzunehmen.

### Ausblick

Die in den diskutierten Experimenten erarbeiteten Erkenntnisse zur Abstrahlcharakteristik der THM, sowie der Anwendung in der Mikrofluidik bieten eine Vielzahl von Möglichkeiten für weitere, systematische Untersuchungen wie auch Anwendungen. In der numerischen Simulation wurden bisher Systeme mit homogenem Brechungsindex betrachtet. Die Einführung von Brechungsindexvariationen mit den Effekten Brechung, Streuung und Reflexion erlaubt die exaktere Berechnung realer Systeme. Dadurch wird die Simulation der Emission von frequenzverdreifachter Strahlung in Rückwärtsrichtung, der Epi-THG-Mikroskopie, ermöglicht. Durch einen zusätzlichen Detektionskanal der frequenzverdreifachten Strahlung in Rückwärtsrichtung ist die experimentelle Untersuchung des Einflusses der Grenzflächenorientierung auf die Epi-THG-Mikroskopie denkbar. Da in der Epi-THG-Mikroskopie Anregungs- und Detektionsstrahlengang vor der Probe liegen, ist ein kompakterer Aufbau und die Untersuchung nicht-transparenter Proben möglich. Zudem bietet eine sensitivere Detektion die Gelegenheit eine von der Grenzflächenorientierung unabhängige, geringe Emission der dritten Harmonischen entlang der optischen Achse zu überprüfen. Evidenzen für diese Strahlung wurden in den Simulationen beobachtet.

Da in vielen Anwendungen der nichtlinear optischen Mikroskopie stark brechende Objektive zur Fokussierung verwendet werden, ist eine systematische Untersuchung des Einflusses der numerischen Apertur des Objektivs in Simulation und Experiment sinnvoll. Darüber hinaus ist eine höhere Aufnahmegeschwindigkeit des Aufbaus durch Verwendung mehrerer Fokusse und eine resonante Bewegung des Galvo-Scanners erreichbar. Eine weitere Steigerung der Aufnahmegeschwindigkeit bietet der Verzicht der axialen Bewegung des Objektivs durch Ausnutzen der chromatischen Aberration in der Fokussierung. In einer spektral aufgelösten Detektion ergibt sich die axiale Fokusposition hierbei durch die Wellenlänge der dritten Harmonischen. Wird zusätzlich die Zentralwellenlänge des Lasers durchgestimmt, lassen sich über den „spektralen Fingerabdruck“ die Probeninhaltsstoffe identifizieren. Numerische Simulationen zeigten, dass der Polarisationszustand der Laserstrahlung einen Einfluss auf die räumliche Fokausdehnung hat. In den Simulationen lässt sich radial polarisierte Strahlung besonders gut fokussieren. Durch einen räumlichen Phasenmodulator im Mikroskopstrahlengang sind kleinere Fokusse und damit eine verbesserte, räumliche Auflösung zu erwarten.

Durch eine erhöhte Aufnahmegeschwindigkeit der THM sind auch dynamische Prozesse in der Mikrofluidik visualisierbar. Somit eröffnet sich beispielsweise die Möglichkeit der Untersuchung struktureller Änderungen thermosensitiver Materialien, die Visualisierung der Dynamik grenzflächenaktiver Substanzen (Tenside) sowie die Bestimmung chemischer Reaktionsdynamiken. Zudem macht eine nähere Betrachtung der Temperaturabhängigkeit der Konversionseffizienz die Beobachtung wandnaher Wärmetransportprozesse denkbar. Die spezifische Abstrahlungscharakteristik verschiedener Grenzflächenorientierungen ermöglicht die Bestimmung der Ausrichtung mikroskopischer Strukturen wie beispielsweise die Messung des Ordnungsparameters von Flüssigkristallen. Ein portables nichtlinear optisches Mikroskop, basierend auf einem Faserlaser und einem bereits umgesetzten,

kompakten Aufbau zur dreidimensionalen Fokuspositionierung sowie frequenzselektiver Detektion könnte in Zukunft die Anwendung der THM erleichtern.

## Abstract

The thesis deals with nonlinear optical microscopy based on third harmonic generation (THG) and second harmonic generation (SHG). In particular, we experimentally study the effect of interface orientations upon the obtained spatial resolution, total yield and emission profile in second and third harmonic microscopy (SHM and THM). Moreover, the thesis contains the first application of THM in the emerging field of microfluidics.

The first part of the thesis presents and discusses systematic experimental investigations with regard to the effect of laser polarization and interface orientation in SHM and THM. The test object is a fused silica capillary in an index-matched liquid, which is entirely invisible for conventional (linear) microscopy. The obtained high-resolution three-dimensional images and two-dimensional lateral cuts of the capillary SHM and THM reveal several characteristic features: First, the direction of the laser polarization plays no role for signal intensity and resolution in the THM image. Second, the direction of the laser polarization leads to a large modulation of the SHM yield. This is due to some residual second order anisotropy even in an amorphous material such as fused silica. Third, the interface orientation affects signal strength and spatial resolution, both in THM as well as SHM. This feature enables spatial characterization of the laser focus. As an (on the first glance) surprising feature, also interfaces oriented parallel to the laser beam direction yield strong harmonic signal. This is due to the larger effective area responsible for harmonic emission in this geometry. Additional experiments reveal a variation of the spatial profile of the emitted third harmonic with the orientation of the interface. The results show, that only at interfaces perpendicular to the direction of the fundamental laser beam, the THG emission profile shows a single intense spot in forward direction. When the interface orientation changes towards parallel with regard to the fundamental beam, the spatial profile of the emitted third harmonic varies significantly. In the case of interface orientations other than perpendicular, the third harmonic intensity profile moves outside the forward direction and develops into a double-spot beam with a large opening angle in between. The intensity ratio between the two intensity spots varies with the interface orientation. It increases towards unity for an interface parallel to the fundamental laser beam. The numerical aperture of the double-spot third harmonic beam exceeds the numerical aperture of the fundamental beam. These findings have important consequences for applications of THM. First, imaging of microscopic interfaces at arbitrary orientation requires THG signal collection at sufficiently large numerical aperture, i.e. beyond the numerical aperture of the

fundamental beam. Second, double-spot THG emission profiles from interfaces of other than perpendicular orientation require careful design of multi-foci THM setups. Third, the dependence of THG emission with interface orientation offers possibilities to determine orientation angles of microscopic surfaces from the intensity distribution in THG emission profiles.

The second part of the thesis demonstrates applications of THM in microfluidics. In particular, we image a microfluidic flow of nonmixing, transparent fluids by THM. Compared to the standard fluorescence microscopy, THM requires no labeling, staining or resonant excitation and visualizes all interfaces. Moreover, we image the near-surface diffusion of two miscible, transparent fluids (i.e. ethanol and water) in a microfluidic device by THM. After calibration with a pure water sample, the third harmonic yield is directly proportional to the ethanol concentration in the sample. Thus, the technique enables direct mapping of ethanol concentrations in microflows near a surface with a spatial resolution in the range of micrometers. From the image, we deduce a diffusion coefficient for ethanol/water samples of  $D = (460 \pm 30) \mu\text{m}^2/\text{s}$ . The investigations clearly demonstrate the potential of THM, even under the challenging conditions of transparent fluids and similar refractive indices. This serves, for example, to obtain information on mixing processes, temperature gradients, or reaction dynamics in microfluidic devices, at large spatial resolution and without perturbation of the samples.

## Anhang A

### Numerische Simulation der THM

#### A.1 Simulation des abgestrahlten Intensitätsprofils

Die analytische Lösung für die elektrische Feldamplitude der frequenzkonvertierten Strahlung aus Gleichung (1.31)

$$A_{0,q\omega}(z) = \frac{i q \omega}{2 \varepsilon_0 n_{q\omega} c} \chi^{(q)} A_{0,\omega}^q \int_{z_0}^z \frac{\exp[i \Delta k z']}{(1 + i z' / \tilde{z})^{q-1}} dz'$$

ermöglicht lediglich die Betrachtung von Grenzflächen, die orthogonal zur Strahlachse verlaufen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit waren jedoch beliebige Orientierungen der Grenzfläche von Interesse. Dazu ist das Volumenintegral aus Gleichung (1.43)

$$\vec{E}^{(3\omega)}(\vec{R}) = \frac{e^{ik_{3\omega}R}}{4\pi R} \vec{e}_i A_{ij} \int_V dV' e^{-ik_{3\omega}\vec{N}\cdot\vec{r}'} P_j^{(3\omega)}(\vec{r}') = \frac{e^{ik_{3\omega}R}}{4\pi R} \vec{e}_i A_{ij} F_j^{(3\omega)}(\Theta, \Phi)$$

mit der Hilfsfunktion  $\vec{F}^{(3\omega)}(\Theta, \Phi)$  zu lösen. Zum Vergleich der Simulation mit den Experimenten der Abstrahlcharakteristik der dritten Harmonischen wird daraus die winkelaufgelöste Intensität

$$I^{(3\omega)}(\Theta, \Phi) = \frac{\varepsilon_0 c}{2} \left| \frac{\vec{e}_i A_{ij}}{4\pi} \int_V dV' e^{-ik_{3\omega}\vec{N}\cdot\vec{r}'} P_j^{(3\omega)}(\vec{r}') \right|^2$$

nach Gleichung (1.48) berechnet, beziehungsweise die Gesamtleistung

$$\Pi^{(3\omega)} = \frac{\varepsilon_0 c}{2} \int_0^{2\pi} d\Phi \int_0^{\Theta_{\max}} d\Theta R^2 \sin \Theta \left| \vec{E}^{(3\omega)}(\vec{R}) \right|^2$$

nach Gleichung (1.44). Diese Gleichungen sind im Allgemeinen nicht analytisch lösbar, sondern erfordern eine numerische Behandlung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in Kooperation mit Dr. Alexander Romanenko von der Kiew National Taras Shevchenko Universität ein Programmcode in C++ entwickelt [102]. Hierzu wird zunächst das erzeugte Feld der dritten Harmonischen im Bereich des Fokus berechnet. Aufgrund der vorliegenden Symmetrie wird ein zylindrisches Koordinatensystem verwendet ( $z' \in [z'_{\min}, z'_{\max}]$ ), mit

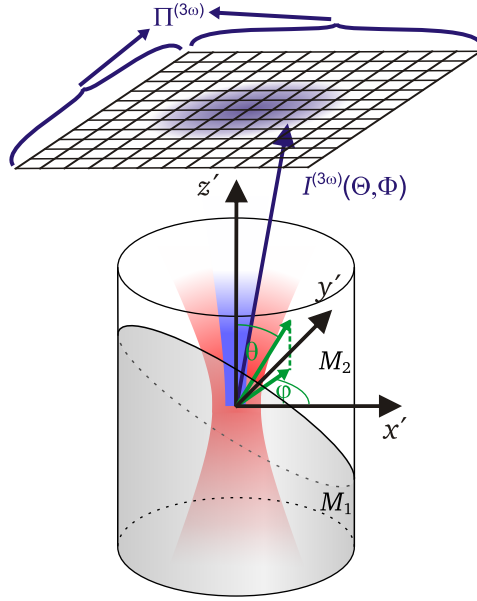


Abbildung A.1: In der Simulation verwendete Geometrie, Orientierung und zugrunde liegende Variablen.

$|z'_{min}|, |z'_{max}| \geq 100 \mu\text{m}$  und  $\rho' \in [0, \rho'_{max}]$ , mit  $|\rho'_{max}| \geq 6 \mu\text{m}$ ). Da lediglich qualitative Ergebnisse der Simulation zu erwarten sind, werden die Suszeptibilitäten der beiden Medien innerhalb des Fokusvolumens zu  $\chi_1 = 1$  und  $\chi_2 = 0$  gewählt. Alle weiteren Parameter werden entsprechend den Messungen gewählt ( $\lambda = 810 \text{ nm}$ ,  $NA_F = 0,22$ , etc.). Analog zu den Auswertungen der Experimente wird die Grenzflächenorientierung durch den Polarwinkel  $\theta$  und den Azimutwinkel  $\varphi$  der Grenzflächennormalen beschrieben. Abbildung A.1 zeigt eine schematische Darstellung der in der Simulation verwendeten Geometrie und Orientierung sowie der zugrunde liegenden Variablen. Aufgrund der verschwindenden Suszeptibilität des zweiten Mediums ist es ausreichend, die Integrationen lediglich über das Volumen des ersten Mediums auszuführen. Somit ergibt sich die Integration zu

$$\vec{F}^{(3\omega)}(\Theta, \Phi) = \int_0^{2\pi} d\varphi' \int_{\rho'_1(\varphi')}^{\rho'_2(\varphi')} d\rho' \int_{z'_1(\rho', \varphi')}^{z'_2(\rho', \varphi')} dz' \rho' \exp[-ik_{3\omega} \vec{N} \cdot \vec{r}'] \vec{P}^{(3\omega)}(\vec{r}'). \quad (\text{A.1})$$

Da in der Simulation beliebige Grenzflächenorientierungen betrachtet werden, sind die Integrationsgrenzen entsprechend der Grenzflächenorientierung zu wählen. Zur Berechnung der Integrationsobergrenze  $z'_2$  des innersten Integrals verwendet man die Orthogonalität der Ortsvektoren der Grenzfläche  $\vec{r}' = (x', y', z'_2)$  und der Grenzflächennormalen  $\vec{n}_i = (n_{i,x'}, n_{i,y'}, n_{i,z'})$

$$\vec{r}' \cdot \vec{n}_i \stackrel{!}{=} 0 \Leftrightarrow z'_2 = \frac{0 - x' n_{i,x'} - y' n_{i,y'}}{n_{i,z'}}. \quad (\text{A.2})$$

In Zylinderkoordinaten vereinfacht sich der Ausdruck zu

$$z'_2 = \frac{0 - \rho' \cos(\varphi' - \varphi) \sin \theta}{\cos \theta}. \quad (\text{A.3})$$

Dieser Ausdruck gilt, solange er kleiner gleich  $z'_{max}$  bleibt. Wird er größer, so gilt  $z'_2 = z'_{max}$ . Analog dazu gilt für kleinere Werte als  $z'_{min}$ , dass  $z'_2 = z'_{min}$  gesetzt wird. Für die Untergrenze gilt stets  $z'_1 = z_{min}$ .

Für die radiale Integrationsgrenze sind drei Fälle, wie in Abbildung A.2 gezeigt, zu unterscheiden.

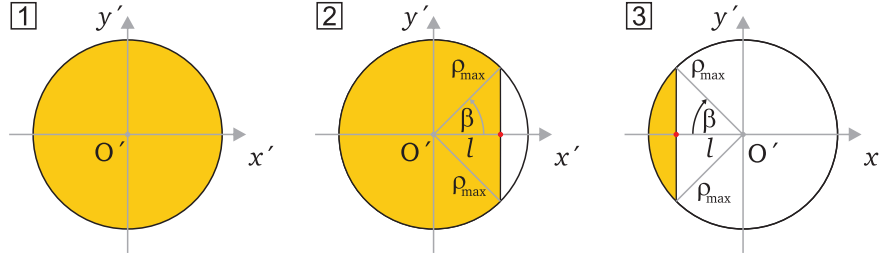


Abbildung A.2: Unterscheidung der drei möglichen Fälle an der Unter- bzw. Oberseite des Integrationszylinders.

- Im ersten Fall, schneidet die Grenzfläche die Unter- bzw. Oberseite des Integrationsvolumens nicht. Hier sind die Grenzen unabhängig von  $\varphi'$ :

$$\rho'_1(\varphi') = 0 \text{ und } \rho'_2(\varphi') = \rho_{max}.$$

In diesem Fall ist die Integrationsreihenfolge von  $\varphi'$  und  $\rho'$  austauschbar.

- In den beiden anderen Fällen schneidet die Grenzfläche die Unter- und Oberseite des Integrationsvolumens. Wir nehmen hier eine Orientierung der Grenzfläche von  $\varphi = 0$  an. Dadurch ergibt sich ein vereinfachtes Skalarprodukt, für die Grenzfläche auf der Unterseite

$$n_{i,x'}l + n_{i,z'}z'_{min} \stackrel{!}{=} 0 \Leftrightarrow l = -\frac{n_{i,z'}z'_{min}}{n_{i,x'}} = -\frac{\cos \theta z'_{min}}{\cos \varphi \sin \theta}. \quad (\text{A.4})$$

Die Position  $l$  auf der  $x'$ -Achse ist die Schnittposition der Grenzfläche und der Unterseite des Integrationsvolumens. Für positive Werte von  $l$  ergibt sich der zweite Fall mit den Grenzen

$$\begin{aligned} &\rho'_1(\varphi') = 0 \quad \text{und} \quad \rho'_2(\varphi') = \rho_{max} \quad \text{für } \varphi' \in [\beta, 2\pi - \beta] \\ \text{bzw.} \quad &\rho'_1(\varphi') = 0 \quad \text{und} \quad \rho'_2(\varphi') = l / \cos \varphi' \quad \text{sonst.} \end{aligned}$$

- Analog dazu ergibt sich der dritte Fall für negative Werte von  $l$  zu

$$\begin{aligned} &\rho'_1(\varphi') = -l / \cos \varphi' \quad \text{und} \quad \rho'_2(\varphi') = \rho_{max} \quad \text{für } \varphi' \in [\pi - \beta, \pi + \beta] \\ \text{bzw.} \quad &\rho'_1(\varphi') = 0 \quad \text{und} \quad \rho'_2(\varphi') = 0 \quad \text{sonst.} \end{aligned}$$

Der Winkel  $\beta$  ergibt sich aus der trigonometrischen Gleichung  $\cos \beta = |l| / \rho_{max}$ .



Die Betrachtung für  $\varphi = 0$  ist allgemein gültig, wenn man  $\varphi'$  durch  $\varphi' - \varphi$  ersetzt. Somit rotiert man das Integrationsvolumen so, dass  $\varphi$  verschwindet. Dies ist nur möglich, wenn die nichtlineare Polarisation bzw. das elektrische Feld radial-symmetrisch ist. Dies ist in den beiden betrachteten Fällen gegeben. Im Fall des in Abschnitt 1.2.2 diskutierten Gauß-Strahls ist eine vollständige radiale Symmetrie gegeben. Betrachtet man die einzelnen Komponenten der in Abschnitt 1.2.1 erläuterten Winkelspektraldarstellung eines fokussierten Laserstrahls

$$\vec{E}_f(\rho, \varphi, z) = \sqrt{\frac{\tilde{n}_\omega}{n_\omega} \frac{ik_\omega f_0}{2}} E_{f,0} e^{-ik_\omega f_0} \begin{pmatrix} (I_{00}(\rho, z) + I_{02}(\rho, z) \cos 2\varphi) \vec{e}_x \\ I_{02}(\rho, z) \sin 2\varphi \vec{e}_y \\ -2iI_{01}(\rho, z) \cos \varphi \vec{e}_z \end{pmatrix},$$

so findet man für die gegebenen experimentellen Parameter

$$\frac{\max|I_{01}|}{\max|I_{00}|} = 9,3 \cdot 10^{-4} \text{ und } \frac{\max|I_{02}|}{\max|I_{00}|} = 2,2 \cdot 10^{-2}. \quad (\text{A.5})$$

Dies zeigt, dass für die in dieser Arbeit gegebenen Bedingungen die Beschreibung durch  $I_{00}$  ausreichend ist. Somit erhält man auch in dieser Betrachtung eine radialsymmetrische und linear in  $x'$ -Richtung polarisierte Feldstärke, so dass die oben genannte Rotation des Integrationsvolumens erlaubt ist.

Das Skalarprodukt der Beobachtungsrichtung  $\vec{N}$  und des Ortsvektors der Integration  $\vec{r}'$  aus Gleichung (A.1) ist gegeben durch

$$\vec{N} \cdot \vec{r}' = \rho' \cos(\Phi - \varphi') \sin \Theta + z' \cos \Theta. \quad (\text{A.6})$$

Damit ergibt sich Gleichung (A.1) zu

$$F^{(3\omega)}(\Theta, \Phi, \theta, \varphi) = \int_0^{2\pi} d\varphi' \int_{\rho'_1(\varphi'-\varphi)}^{\rho'_2(\varphi'-\varphi)} d\rho' \int_{z'_1(\rho', \varphi'-\varphi)}^{z'_2(\rho', \varphi'-\varphi)} dz' \rho' \\ \times \exp[-ik_{3\omega}(\rho' \cos(\Phi - \varphi') \sin \Theta + z' \cos \Theta)] P^{(3\omega)}(\vec{r}').$$

Wird das Integrationsvolumen wie oben beschrieben rotiert, so ist die Substitution  $\varphi' \rightarrow \varphi'^* = \varphi' - \varphi$  durchzuführen:

$$F^{(3\omega)}(\Theta, \Phi, \theta, \varphi) = \int_0^{2\pi} d\varphi'^* \int_{\rho'_1(\varphi'^*)}^{\rho'_2(\varphi'^*)} d\rho' \int_{z'_1(\rho', \varphi'^*)}^{z'_2(\rho', \varphi'^*)} dz' \rho' \\ \times \exp[-ik_{3\omega}(\rho' \cos(\Phi - \varphi'^* - \varphi) \sin \Theta + z' \cos \Theta)] P^{(3\omega)}(\vec{r}').$$

Aufgrund der Periodizität der relevanten Funktionen ist keine Anpassung der Grenzen der Integration über  $\varphi'^*$  nötig. Somit hängt die Hilfsfunktion  $F^{(3\omega)}$  lediglich vom Effektivwinkel  $(\Phi - \varphi)$  ab. Es genügt also die Funktion

$$F_0^{(3\omega)}(\Theta, \Phi, \theta) = F^{(3\omega)}(\Theta, \Phi, \theta, \varphi = 0)$$

bei einem Azimutwinkel der Grenzfläche  $\varphi = 0$  zu berechnen. Für alle anderen Grenzflächenorientierung erhält man die Funktion  $F^{(3\omega)}$  durch Koordinatenverschiebung

$$F^{(3\omega)}(\Theta, \Phi, \theta, \varphi) = F_0^{(3\omega)}(\Theta, \Phi - \varphi, \theta).$$

Eine ähnliche Abhängigkeit ergibt sich für die daraus resultierende Intensität [102]

$$I^{(3\omega)}(\Theta, \Phi, \theta, \varphi) \propto (\cos^2 \Theta + \sin^2 \Theta \sin^2 \Phi) |F^{(3\omega)}(\Theta, \Phi, \theta, \varphi)|^2 \quad (\text{A.7})$$

$$\propto (\cos^2 \Theta + \sin^2 \Theta \sin^2 \Phi) |F_0^{(3\omega)}(\Theta, \Phi - \varphi, \theta)|^2 \quad (\text{A.8})$$

Bei Rotation der Grenzfläche um die Strahlachse rotiert das Intensitätsprofil im Wesentlichen mit. Lediglich eine geringe periodische Modulation durch die Änderung der Beobachtungsrichtung ist erkennbar.

Gleichung (A.8) lässt sich numerisch berechnen. Da es sich beim Integranden um eine sehr schnell oszillierende Funktion handelt (vor allem in  $z'$  Integration) wird hier die Gauß-Kronrod-Vorschrift ( $G_7K_{15}$ ) verwendet [102, 103]. Die Ergebnisse dieser Simulation sind im Kapitel 3 zu finden.

## A.2 Simulation der emittierten Gesamtleistung

Die Gesamtleistung lässt sich nach Gleichung (1.45) durch Integration der Intensität über alle detektierten Raumrichtungen bestimmen zu

$$\Pi^{(3\omega)}(\theta, \varphi) = \int_0^{2\pi} d\Phi \int_0^{\Theta_{\max}} d\Theta \sin \Theta I^{(3\omega)}(\Theta, \Phi, \theta, \varphi).$$

Dies ergibt sich mit Gleichung (A.8) und der numerischen Konstante  $C$  zu

$$\Pi^{(3\omega)}(\theta, \varphi) = C \int_0^{2\pi} d\Phi \int_0^{\Theta_{\max}} d\Theta \sin \Theta (\cos^2 \Theta + \sin^2 \Theta \sin^2 \Phi) |F_0^{(3\omega)}(\Theta, \Phi - \varphi, \theta)|^2. \quad (\text{A.9})$$

Mit der Substitution  $\Phi^* = \Phi - \varphi$  erhält man

$$\begin{aligned} \Pi^{(3\omega)}(\theta, \varphi) = C \int_0^{2\pi} d\Phi^* \int_0^{\Theta_{\max}} d\Theta \sin \Theta \\ \times [\cos^2 \Theta + \sin^2 \Theta \sin^2(\Phi^* + \varphi)] |F_0^{(3\omega)}(\Theta, \Phi^*, \theta)|^2. \quad (\text{A.10}) \end{aligned}$$

Aufgrund der Periodizität aller Terme des Integranden ist eine Transformation der Integrationsgrenzen bei der Substitution nicht nötig. Mit den trigonometrischen Umformungen

- $\sin^2(\Phi + \varphi) = \frac{1}{2} - \frac{1}{2} \cos(2\Phi + 2\varphi)$
- $\sin^2 \theta + \cos^2 \theta = 1$
- $\cos(2\Phi + 2\varphi) = \cos 2\Phi \cdot \cos 2\varphi - \sin 2\Phi \cdot \sin 2\varphi$

erhält man der Reihe nach

$$\begin{aligned} \Pi^{(3\omega)}(\theta, \varphi) &= C \int_0^{2\pi} \int_0^{\Theta_{\max}} \sin \Theta \left[ \cos^2 \Theta + \sin^2 \Theta \left( \frac{1}{2} - \frac{1}{2} \cos [2\Phi^* + 2\varphi] \right) \right] \\ &\quad \times |F_0^{(3\omega)}(\Theta, \Phi^*, \theta)|^2 d\Theta d\Phi^* \\ \Pi^{(3\omega)}(\theta, \varphi) &= C \int_0^{2\pi} \int_0^{\Theta_{\max}} \left( \sin \Theta \left[ \frac{1}{2} \cos^2 \Theta + \frac{1}{2} \right] - \frac{1}{2} \sin^3 \Theta \cos [2\Phi^* + 2\varphi] \right) \\ &\quad \times |F_0^{(3\omega)}(\Theta, \Phi^*, \theta)|^2 d\Theta d\Phi^* \\ \Pi^{(3\omega)}(\theta, \varphi) &= \frac{C}{2} \int_0^{2\pi} \int_0^{\Theta_{\max}} \left( \cos^2 \Theta + 1 - \sin^2 \Theta [\cos 2\Phi^* \cos 2\varphi - \sin 2\Phi^* \sin 2\varphi] \right) \\ &\quad \times \sin \Theta |F_0^{(3\omega)}(\Theta, \Phi^*, \theta)|^2 d\Theta d\Phi^*. \end{aligned}$$

Da es sich bei dem Term  $\sin 2\Phi^*$  um eine Funktion handelt, die punktsymmetrisch um  $\pi$  ist und nur mit achsensymmetrischen Termen um  $\pi$  multipliziert wird, verschwindet dieser Teil des Integrals

$$\begin{aligned} \Pi^{(3\omega)}(\theta, \varphi) &= \frac{C}{2} \int_0^{2\pi} \int_0^{\Theta_{\max}} \left( \sin \Theta [\cos^2 \Theta + 1] - \sin^3 \Theta \cos 2\Phi^* \cos 2\varphi \right) \\ &\quad \times |F_0^{(3\omega)}(\Theta, \Phi^*, \theta)|^2 d\Theta d\Phi^*. \end{aligned}$$

Dies lässt sich mit den Definitionen

$$A^{(3\omega)}(\theta) = \frac{C}{2} \int_0^{2\pi} \int_0^{\Theta_{\max}} \sin \Theta [\cos^2 \Theta + 1] \times |F_0^{(3\omega)}(\Theta, \Phi^*, \theta)|^2 d\Theta d\Phi^* \quad (\text{A.11})$$

$$B^{(3\omega)}(\theta) = \frac{C}{2} \int_0^{2\pi} \int_0^{\Theta_{\max}} \sin^3 \Theta \cos 2\Phi^* \cos 2\varphi \times |F_0^{(3\omega)}(\Theta, \Phi^*, \theta)|^2 d\Theta d\Phi^* \quad (\text{A.12})$$

vereinfachen zu

$$\Pi^{(3\omega)}(\theta, \varphi) = A^{(3\omega)}(\theta) - B^{(3\omega)}(\theta) \cdot \cos 2\varphi. \quad (\text{A.13})$$

Für eine feste Grenzflächenneigung  $\theta$  moduliert die emittierte Gesamtleistung der dritten Harmonischen mit der Grenzflächenorientierung  $\varphi$ . Die Gesamtleistung wird maximal für eine Orientierung der Grenzfläche parallel zur Laserpolarisation

( $\hat{=}$   $\varphi = \pi/2$ ) und minimal orthogonal dazu. Für eine Grenzfläche mit rotierender Orientierung ergibt sich somit eine relative Modulationstiefe von

$$\begin{aligned} \frac{\Pi^{(3\omega)}(\theta, \pi/2) - \Pi^{(3\omega)}(\theta, 0)}{\Pi^{(3\omega)}(\theta, \pi/2)} &= \frac{[A^{(3\omega)}(\theta) + B^{(3\omega)}(\theta)] - [A^{(3\omega)}(\theta) - B^{(3\omega)}(\theta)]}{A^{(3\omega)}(\theta) + B^{(3\omega)}(\theta)} \\ &= \frac{2B^{(3\omega)}(\theta)}{A^{(3\omega)}(\theta) + B^{(3\omega)}(\theta)}. \end{aligned}$$

Für transversal verlaufende Grenzflächen ( $\theta = 0$ ), welche invariant gegen Änderungen in  $\varphi$  sind, verschwindet  $B^{(3\omega)}(\theta)$  und sinngemäß auch die relative Modulationstiefe [102]. Für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten experimentellen Parameter und longitudinal verlaufende Grenzflächen ( $\theta = \pi/2$ ) ergibt sich eine Modulationstiefe von 5% [104].

Die zur Berechnung der Gesamtleistung nötige, zweidimensionale Integration wird in der Simulation numerisch ausgeführt. Im Programmcode werden wahlweise die Algorithmen der Zentralpunktregel, der Trapezregel, der Gauß-Regel 4.Ordnung und der Gauß-Regel 6.Ordnung genutzt [102].

## Literaturverzeichnis

- [1] D. Gerlach. *Geschichte der Mikroskopie*. Harri Deutsch, Frankfurt am Main (2009)
- [2] A. Zumbusch. *Einblick in das Unsichtbare*. Physik Journal **4** (2005)(7) 31–37
- [3] R. Carriles, D. Schafer, K. Sheetz, J. Field, R. Cisek, V. Barzda, A. Sylvester, J. Squier. *Invited review article: Imaging techniques for harmonic and multi-photon absorption fluorescence microscopy*. Rev. Sci. Instrum. **80** (2009)(8) 081101
- [4] R. Hellwarth, P. Christensen. *Nonlinear Optical Microscope Using Second Harmonic Generation*. Appl. Opt. **14** (1975)(2) 247–248
- [5] Y. Barad, H. Eisenberg, M. Horowitz, Y. Silberberg. *Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation*. Appl. Phys. Lett. **70** (1997)(8) 922–924
- [6] F. Aptel, N. Olivier, A. Deniset-Besseau, J.-M. Legeais, K. Plamann, M.-C. Schanne-Klein, E. Beaurepaire. *Multimodal nonlinear imaging of the human cornea*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **51** (2010)(5) 2459–65
- [7] N. Olivier, M. A. Luengo-Oroz, L. Duloquin, E. Faure, T. Savy, I. Veilleux, X. Solinas, D. Debarre, P. Bourguine, A. Santos, N. Peyrieras, E. Beaurepaire. *Cell Lineage Reconstruction of Early Zebrafish Embryos Using Label-Free Non-linear Microscopy*. Science **329** (2010)(5994) 967–971
- [8] D. Yelin, Y. Silberberg. *Laser scanning third-harmonic generation microscopy in biology*. Opt. Express **5** (1999)(8) 169–175
- [9] N. G. Horton, K. Wang, D. Kobat, C. G. Clark, F. W. Wise, C. B. Schaffer, C. Xu. *In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain*. Nature Photonics **7** (2013)(3) 205–209
- [10] R. D. Schaller, P. T. Snee, J. C. Johnson, L. F. Lee, K. R. Wilson, L. H. Haber, R. J. Saykally, T.-Q. Nguyen, B. J. Schwartz. *Nanoscopic interchain aggregate domain formation in conjugated polymer films studied by third harmonic generation near-field scanning optical microscopy*. The Journal of Chemical Physics **117** (2002)(14) 6688–6698
- [11] C. L. Evans, X. S. Xie. *Coherent anti-stokes Raman scattering microscopy: chemical imaging for biology and medicine*. Annu. Rev. Anal. Chem. **1** (2008) 883–909

- [12] R. S. Pillai, M. Oh-e, H. Yokoyama, G. J. Brakenhoff, M. Müller. *Imaging colloidal particle induced topological defects in a nematic liquid crystal using third-harmonic generation microscopy*. Opt. Express **14** (2006)(26) 12976–12983
- [13] D. Yelin, Y. Silberberg, Y. Barad, J. S. Patel. *Phase-matched third-harmonic generation in a nematic liquid crystal cell*. Phys. Rev. Lett. **82** (1999)(15) 3046–3049
- [14] S.-H. Chia, C.-H. Yu, C.-H. Lin, N.-C. Cheng, T.-M. Liu, M.-C. Chan, I.-H. Chen, C.-K. Sun. *Miniaturized video-rate epi-third-harmonic-generation fiber-microscope*. Opt. Express **18** (2010)(16) 17382–17391
- [15] N. Olivier, F. Aptel, K. Plamann, M.-C. Schanne-Klein, E. Beaurepaire. *Harmonic microscopy of isotropic and anisotropic microstructure of the human cornea*. Opt. Express **18** (2010)(5) 5028–5040
- [16] S.-P. Tai, T.-H. Tsai, W.-J. Lee, D.-B. Shieh, Y.-H. Liao, H.-Y. Huang, K. Zhang, H.-L. Liu, C.-K. Sun. *Optical biopsy of fixed human skin with backward-collected optical harmonics signals*. Opt. Express **13** (2005)(20) 8231–8242
- [17] R. Boyd. *Nonlinear optics*. Academic Press, 3rd editio Aufl. (2008)
- [18] E. Hanamura, Y. Kawabe, A. Yamanaka. *Quantum Nonlinear Optics*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg (2007)
- [19] T. Halfmann. *Vorlesungsskript SS 2007: Laser Physics - Applications -* (2007)
- [20] B. E. A. Saleh, M. C. Teich. *Fundamentals of photonics*. John Wiley & Sons Ltd., NEW YORK / CHICHESTER / BRISBANE / TORONTO / SINGAPORE (1991)
- [21] J.-X. Cheng, X. Xie. *Green's function formulation for third-harmonic generation microscopy*. J. Opt. Soc. Am. B **19** (2002)(7) 1604–1610
- [22] W. Demtröder. *Experimentalphysik 2: Elektrizität und Optik*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (2009)
- [23] D. Mills. *Nonlinear optics*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (1991)
- [24] W. Nolting. *Grundkurs Theoretische Physik 3: Elektrodynamik*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (2011)
- [25] L. Novotny, B. Hecht. *Principles of Nano-Optics*. Cambridge University Press, Cambridge (2006)
- [26] F. Pedrotti, L. Pedrotti, W. Bausch, H. Schmidt. *Optik für Ingenieure*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 3. Aufl. (2005)
- [27] J. F. Ward, G. H. C. New. *Optical Third Harmonic Generation in Gases by a Focused Laser Beam*. Phys. Rev. **185** (1969)(1) 57–73

- [28] F. Wagner. *Nichtlinear optische 3D-Mikroskopie transparenter Proben*. Master-thesis, TU Darmstadt (2010)
- [29] U. Gubler, C. Bosshard. *Optical third-harmonic generation of fused silica in gas atmosphere: Absolute value of the third-order nonlinear optical susceptibility  $\chi(3)$* . Phys. Rev. B **61** (2000)(16) 10702–10710
- [30] C. Bosshard, U. Gubler, P. Kaatz, W. Mazerant, U. Meier. *Non-phase-matched optical third-harmonic generation in noncentrosymmetric media: Cascaded second-order contributions for the calibration of third-order nonlinearities*. Phys. Rev. B **61** (2000)(16) 688–701
- [31] P. Günter. *Nonlinear Optical Effects and Materials*. Springer (2000)
- [32] J. Eichler, H. J. Eichler. *Laser: Bauformen, Strahlführung, Anwendungen*. Springer-Verlag, 6 Aufl. (2006)
- [33] Spectra-Physics. *Tsunami: Mode-locked Ti:sapphire Laser - User's Manual* - (1995)
- [34] C. Rulliere. *Femtosecond Laser Pulses*. Springer (2005)
- [35] R. Trebino. *Frequency-resolved optical gating: the measurement of ultrashort laser pulses*. Kluwer Academic Publishers (2000)
- [36] CVI Melles Griot. *Fundamental Optics: Ultrafast Theory* (2012)
- [37] D. Meschede. *Optik, Licht und Laser*. Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden, 3rd Aufl. (2008)
- [38] P. E. Ciddor. *Refractive index of air: new equations for the visible and near infrared*. Appl. Opt. **35** (1996)(9) 1566–1573
- [39] I. H. Malitson. *Interspecimen comparison of the refractive index of fused silica*. J. Opt. Soc. Am. A **55** (1965)(10) 1205–1209
- [40] C. Stock. *Resonant überhöhte nichtlineare optische Mikroskopie*. Master-thesis, TU Darmstadt (2012)
- [41] S. Witte, A. Negrean, J. C. Lodder, C. P. J. de Kock, G. Testa Silva, H. D. Mansvelder, M. Louise Groot. *Label-free live brain imaging and targeted patching with third-harmonic generation microscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108** (2011)(15) 5970–5975
- [42] K. Sheetz, E. E. Hoover, R. Carriles, D. Kleinfeld, J. Squier. *Advancing multifocal nonlinear microscopy: development and application of a novel multibeam Yb:KGd(WO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> oscillator*. Opt. Express **16** (2008)(22) 17574–17584
- [43] B. Pearson, T. Weinacht. *Nonlinear optics: Three-in-one microscopy*. Nat. Phot. **6** (2012)(February) 78–80

- [44] E. E. Hoover, J. Squier. *Advances in multiphoton microscopy technology*. Nat. Phot. **7** (2013)(2) 93–101
- [45] W. R. Zipfel, R. M. Williams, W. W. Webb. *Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences*. Nat. Biotechnol. **21** (2003)(11) 1369–77
- [46] R. M. Williams, W. R. Zipfel, W. W. Webb. *Interpreting second-harmonic generation images of collagen I fibrils*. Biophysical journal **88** (2005)(2) 1377–1386
- [47] M. Müller, J. Squier, K. R. Wilson, G. J. Brakenhoff. *3D microscopy of transparent objects using third harmonic generation*. J. Microsc. **191** (1998)(3) 266–274
- [48] J. Squier, M. Müller, G. J. Brakenhoff, K. R. Wilson. *Third harmonic generation microscopy*. Opt. Express **3** (1998)(9) 315–324
- [49] R. Barille, L. Canioni, L. Sarger, G. Rivoire. *Nonlinearity measurements of thin films by third-harmonic-generation microscopy*. Phys. Rev. E **66** (2002)(6) 067602
- [50] N. Olivier, E. Beaurepaire. *Third-harmonic generation microscopy with focus-engineered beams: a numerical study*. Opt. Express **16** (2008)(19) 14703–14715
- [51] D. Oron, E. Tal, Y. Silberberg. *Depth-resolved multiphoton polarization microscopy by third-harmonic generation*. Opt. Lett. **28** (2003)(23) 2315–2317
- [52] O. Schwartz, D. Oron. *Background-free third harmonic imaging of gold nanorods*. Nano letters **9** (2009)(12) 4093–4097
- [53] O. Masihzadeh, P. Schlup, R. A. Bartels. *Control and measurement of spatially inhomogeneous polarization distributions in third-harmonic generation microscopy*. Opt. Lett. **34** (2009)(7) 1090–1092
- [54] C. Wenski. *Temperaturabhängigkeit und Abstrahlcharakteristik in der nicht-linearen optischen Mikroskopie*. Master-thesis, TU Darmstadt (2012)
- [55] F. J. Rodriguez, F. X. Wang, M. Kauranen. *Calibration of the second-order nonlinear optical susceptibility of surface and bulk of glass*. Opt. Express **16** (2008)(12) 8704–8710
- [56] E. Hering, R. Martin, M. Stohrer. *Taschenbuch der Mathematik und Physik*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg (2009)
- [57] U. Petzold, A. Büchel, T. Halfmann. *Effects of laser polarization and interface orientation in harmonic generation microscopy*. Opt. Express **20** (2012)(4) 3654–3662
- [58] J. M. Schins, T. Schrama, J. Squier, G. J. Brakenhoff, M. Müller. *Determination of material properties by use of third-harmonic generation microscopy*. J. Opt. Soc. Am. B **19** (2002)(7) 1627–1634



- [59] E. Tal, D. Oron, Y. Silberberg. *Improved depth resolution in video-rate line-scanning multiphoton microscopy using temporal focusing*. Opt. Lett. **30** (2005)(13) 1686–1688
- [60] M. Kobayashi, K. Fujita, T. Kaneko, T. Takamatsu, O. Nakamura, S. Kawata. *Second-harmonic-generation microscope with a microlens array scanner*. Opt. Lett. **27** (2002)(15) 1324–1326
- [61] T. Minamikawa, M. Hashimoto, K. Fujita, S. Kawata, T. Araki. *Multi-focus excitation coherent anti-Stokes Raman scattering ( CARS ) microscopy and its applications for real-time imaging*. Opt. Express **17** (2009)(12) 9526–9536
- [62] D. Fittinghoff, P. Wiseman, J. Squier. *Widefield multiphoton and temporally decorrelated multifocal multiphoton microscopy*. Opt. Express **7** (2000)(8) 273–279
- [63] T. Porwol, A. R. Strohmaier, E. Spiess. *Methods in enzymology: confocal microscopy*. Academic Press, San Diego (1999)
- [64] L. Moreaux, O. Sandre, S. Charpak, M. Blanchard-Desce, J. Mertz. *Coherent scattering in multi-harmonic light microscopy*. Biophys. J. **80** (2001)(3) 1568–1574
- [65] U. Petzold, C. Wenski, A. Romanenko, T. Halfmann. *Spatial emission profiles at different interface orientations in third harmonic generation microscopy*. J. Opt. Soc. Am. B **30** (2013)(6) 1725
- [66] D. Debarre, N. Olivier, E. Beaurepaire. *Signal epidetection in third-harmonic generation microscopy of turbid media*. Opt. Express **15** (2007)(14) 8913–8924
- [67] D. Oron, Y. Silberberg. *Third-harmonic generation with cylindrical Gaussian beams*. J. Opt. Soc. Am. B **21** (2004)(11) 1964–1968
- [68] A. Tripathi, T. V. Chokshi, N. Chronis. *A high numerical aperture, polymer-based, planar microlens array*. Opt. Express **17** (2009)(22) 19908–19918
- [69] T. Squires, S. Quake. *Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale*. Rev. Mod. Phys. **77** (2005)(3) 977–1026
- [70] K.-I. Ohno, K. Tachikawa, A. Manz. *Microfluidics: applications for analytical purposes in chemistry and biochemistry*. Electrophoresis **29** (2008)(22) 4443–4453
- [71] S. Neethirajan, I. Kobayashi, M. Nakajima, D. Wu, S. Nandagopal, F. Lin. *Microfluidics for food, agriculture and biosystems industries*. Lab Chip **11** (2011)(9) 1574–1586
- [72] P. S. Dittrich, A. Manz. *Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery*. Nat. Rev. Drug Discov. **5** (2006)(3) 210–218

- [73] L. Kang, B. G. Chung, R. Langer, A. Khademhosseini. *Microfluidics for drug discovery and development: from target selection to product lifecycle management*. Drug Discov. Today **13** (2008)(1-2) 1–13
- [74] B. Huang, H. Wu, D. Bhaya, A. Grossman, S. Granier, B. K. Kobilka, R. N. Zare. *Counting low-copy number proteins in a single cell*. Science **315** (2007)(5808) 81–84
- [75] A. Abou-Hassan, O. Sandre, V. Cabuil. *Microfluidics in inorganic chemistry*. Angew. Chem. Int. Ed. **49** (2010)(36) 6268–6286
- [76] V. Hessel, A. Renken, J. C. Schonten, J.-I. Yoshida (Hg.). *Micro Process Engineering*, Bd. 3. Wiley-VCH, Weinheim (2008)
- [77] A. Büchel. *Nichtlineare optische 3D-Mikroskopie in der Mikrofluidik*. Projekt-proposal, TU Darmstadt (2011)
- [78] A. Büchel. *Nichtlineare optische 3D-Mikroskopie in der Mikrofluidik*. Master-thesis, TU Darmstadt (2011)
- [79] W. Demtröder. *Experimentalphysik 1: Mechanik und Wärme*. Springer-Verlag, 5., neu be Aufl. (2008)
- [80] A. N. Cleland. *foundation of nanomechanics*. Springer, Heidelberg (2003)
- [81] T. Hahn, S. Hardt. *Size-dependent detachment of DNA molecules from liquid-liquid interfaces*. Soft Matter **7** (2011)(13) 6320
- [82] T. Hahn. *Interfacial electrokinetic transport phenomena and their impact on DNA electrophoresis in microfluidics*. Dissertation, TU Darmstadt (2011)
- [83] S. Ray, G. Mehta, S. Srivastava. *Label-free detection techniques for protein microarrays: prospects, merits and challenges*. Proteomics **10** (2010)(4) 731–748
- [84] M. Koralewski, F. Reinholz, J. Karoe, K. Waraczewski. *Refractive and Chiroptical Properties of Clinical Dextran*. Polish J. of Environ. Stud. **15** (2006)(4) 66–68
- [85] Sheltonscientific-IBI. *IBI Reagents #33: Specifications TRIS-Borate EDTA Buffer (TBE)*
- [86] M. Daimon, A. Masumura. *Measurement of the refractive index of distilled water from the near-infrared region to the ultraviolet region*. Appl. Opt. **46** (2007)(18) 3811–3820
- [87] JECFA. *Specifications of Polydimethylsiloxane, FAO JECFA Monographs 5* (2008)
- [88] C. Stock. *Erweiterung eines nichtlinearen optischen Mikroskops zur Detektion frequenzverdoppelter Strahlung*. Bachelor-thesis, TU Darmstadt (2011)

- [89] P. Pantazis, J. Maloney, D. Wu, S. E. Fraser. *Second harmonic generating (SHG) nanoprobes for in vivo imaging*. PNAS **107** (2010)(33) 14535–40
- [90] J. Rheims, J. Köser, T. Wriedt. *Refractive-index measurements in the near-IR using an Abbe refractometer*. Meas. Sci. Technol. **8** (1997)(6) 601–605
- [91] U. Petzold, A. Büchel, S. Hardt, T. Halfmann. *Imaging diffusion in a microfluidic device by third harmonic microscopy*. Exp. Fluids **53** (2012)(3) 777–782
- [92] L. Zhang, Q. Wang, Y.-C. Liu, L.-Z. Zhang. *On the mutual diffusion properties of ethanol-water mixtures*. J. Chem. Phys. **125** (2006)(10) 104502
- [93] M. T. Tyn, W. F. Calus. *Temperature and concentration dependence of mutual diffusion coefficients of some binary liquid systems*. J. Chem. Eng. Data **20** (1975)(3) 310–316
- [94] C. Hany, H. Lebrun, C. Pradere, J. Toutain, J.-C. Batsale. *Thermal analysis of chemical reaction with a continuous microfluidic calorimeter*. Chem. Eng. J. **160** (2010)(3) 814–822
- [95] H.-J. Warnecke, D. Bothe, A. Zrenner, G. Berth, K.-P. Hüsck. *Modellbasierte Bestimmung lokal gültiger Kinetiken chemischer Reaktionen in Flüssigphase mittels Flachbettmikroreaktor*. Chemi. Ing. Tech. **82** (2010)(3) 251–258
- [96] T. Kissel. *Spektroskopische Methoden zur Charakterisierung wandnaher Verbrennungsvorgänge*. Dissertation, TU Darmstadt (2011)
- [97] J. Brübach, C. Pflitsch, A. Dreizler, B. Atakan. *On surface temperature measurements with thermographic phosphors: A review*. Progress in Energy and Combustion Science **39** (2013)(1) 37–60
- [98] T. Kissel, E. Baum, A. Dreizler, J. Brübach. *Two-dimensional thermographic phosphor thermometry using a CMOS high speed camera system*. Appl. Phys. B **96** (2009)(4) 731–734
- [99] R. D. Muir, D. J. Kissick, G. J. Simpson. *Statistical connection of binomial photon counting and photon averaging in high dynamic range beam-scanning microscopy*. Opt. Express **20** (2012)(9) 10406–10415
- [100] S. Yang, Q. Zhan. *Third-harmonic generation microscopy with tightly focused radial polarization*. J. Opt. A: Pure Appl. Opt. **10** (2008)(12) 125103
- [101] E. Y. S. Yew, C. J. R. Sheppard. *Second harmonic generation polarization microscopy with tightly focused linearly and radially polarized beams*. Opt. Comm. **275** (2007)(2) 453–457
- [102] A. Romanenko. *THG simulation - documentation to simulation* (2012)
- [103] D. Kahaner, C. Moler, S. Nash. *Numerical methods and software*. Prentice-Hall, Inc. (1989)

- [104] *Private Unterhaltung mit A. Romanenko (15.10.2012): Die Modulationstiefe rotierender longitudinaler Grenzflächen liegt bei den gegebenen experimentellen Parametern bei etwa fünf Prozent und wächst mit steigender NA des fokussierenden Objektivs.*

## Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

### Publikationen in internationalen, begutachteten Fachzeitschriften

- U. Petzold, A. Büchel und T. Halfmann, *Effects of laser polarization and interface orientation in harmonic generation microscopy*. Opt. Expr. 20, 3654 (2012)
- U. Petzold, A. Büchel und T. Halfmann, *Imaging diffusion in a microfluidic device by third harmonic microscopy*. Exp. Fluids 53, 777 (2012)
- U. Petzold, C. Wenski, A. Romanenko und T. Halfmann, *Spatial emission profiles at different interface orientations in third harmonic generation microscopy*. J. Opt. Soc. Am. B 30, 1725 (2013)

### Beiträge zu nationalen und internationalen Tagungen

- U. Petzold, A. Büchel und T. Halfmann, *Applications and investigations of third harmonic microscopy in microfluidics*. DPG Frühjahrstagung 2012, Stuttgart (Poster)
- U. Petzold, A. Büchel und T. Halfmann, *Applications and investigations of third harmonic microscopy in microfluidics*. 2<sup>nd</sup> Multimodal Nonlinear Optical Microscopy Symposium/Workshop 2012, Lafayette - USA (Poster)
- U. Petzold und T. Halfmann, *Characterization and applications of third harmonic generation microscopy*. 523<sup>rd</sup> WE-Heraeus Seminar High harmonic spectroscopy 2013, Bad Honnef (Poster)

### Sonstige Beiträge zu wissenschaftlichen Veranstaltungen

- U. Petzold und T. Halfmann, *Coherent nonlinear optics in diagnostics of transport processes*. GRK 1114 Klausurtagung 2010, Maulbronn (Poster und Vortrag)
- U. Petzold und T. Halfmann, *Coherent nonlinear optics in diagnostics of transport processes*. GRK 1114 Klausurtagung 2011, Bad Münster am Stein (Poster und Vortrag)
- A. Büchel, U. Petzold und T. Halfmann, *Advanced characterization of third harmonic microscopy*. GRK 1114 Klausurtagung 2012, Heppenheim (Poster und Vortrag)

## Betreute Bachelor- und Masterarbeiten

### Bachelorarbeiten

- Christian Wenski, *Aufbau eines Einzelpuls-Autokorrelators für Femtosekunden-Laserpulse*, TU Darmstadt, 2010.
- Christian Stock, *Erweiterung eines nichtlinearen optischen Mikroskops zur Detektion frequenzverdoppelter Strahlung*, TU Darmstadt, 2011.
- Nico Neumann, *Aufbau eines kompakten, nichtlinearen optischen Mikroskops*, TU Darmstadt, 2012.

### Masterarbeiten

- Florian Wagner, *Nichtlinear optische 3D-Mikroskopie transparenter Proben*, TU Darmstadt, 2010.
- Andreas Büchel, *Nichtlineare optische 3D-Mikroskopie in der Mikrofluidik*, TU Darmstadt, 2011.
- Patric Ackermann, *Erzeugung Hoher Harmonischer mit Laserpulsen im grünen Spektralbereich*, TU Darmstadt, 2011.
- Christian Wenski, *Temperaturabhängigkeit und Abstrahlcharakteristik in der nichtlinearen optischen Mikroskopie*, TU Darmstadt, 2012.

## Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## Danksagung

Zunächst gebührt mein Dank natürlich meinem Doktorvater THOMAS HALFMANN schließlich hast Du mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht. Es freut mich, dass Du mich als Doktorand aufgenommen hast und wir gemeinsam den „Testballon“ der nichtlinear optischen Mikroskopie gestartet haben. Du hast mich stets unterstützt und motiviert, sowie in kritischen Situationen beraten als auch wenn nötig korrigiert. Es freut mich zu sehen, dass der „Testballon“ auch nach meinem Abgang aus dem Projekt „weiterfliegen“ wird. Vielen Dank für Dein Vertrauen in mich.

Neben dem Doktorvater bedarf es einem Zweitgutachter: PROFESSOR WALTHER. Ich weiß es wirklich zu schätzen, dass Sie sich trotz Ihres engen Terminkalenders dieser Aufgabe angenommen haben. Vielen Dank dafür.

Für Ihre großartige wissenschaftliche Unterstützung möchte ich mich bei STEFFEN HARDT und THOMAS HAHN bedanken, Ihr habt meine Arbeit in der Thematik der Mikrofluidik erheblich erleichtert und mir vor allem bei der Publikation in diesem Fachgebiet viel weitergeholfen. Weiterhin bin ich auch BRUCE SHORE, ALEXANDER ROMANENKO und LEONID YATSENKO zu Dank verpflichtet für Eure wertvollen Beiträge und Diskussionen zur Theorie der nichtlinear optischen Mikroskopie. Besonderer Dank in dieser Riege gebührt ALEXANDER ROMANENKO, Du hast mit mir in mühevoller Kleinarbeit die Simulation der THM realisiert.

Ein besonderer Dank gilt auch den zahlreichen Bachelor- und Masterstudenten, die ich während meiner Promotion betreut habe; in chronologischer Reihenfolge: CHRISTIAN WENSKI (BSc), FLORIAN WAGNER (MSc), CHRISTIAN STOCK (BSc), ANDREAS BÜCHEL (MSc), PATRIC ACKERMANN (MSc), NICO NEUMANN (BSc) UND NOCHMAL CHRISTIAN WENSKI (MSc). Ohne Eure Abschlussarbeiten wäre meine Dissertation um einige Aspekte ärmer. Die Arbeit mit Euch hat mich neben den wissenschaftlichen Ergebnissen auch persönlich bereichert. Es hat mir viel Freude bereitet mit Euch – jungen, wissenshungrigen und allesamt cleveren Studenten – arbeiten zu dürfen. Generell war die Stimmung in der gesamten Arbeitsgruppe immer ausgezeichnet. Dafür möchte ich vor allem meinen Mitdoktoranden FABIAN BEIL, HOLGER MÜNCH, GEORG HEINZE, FRANK BLATT, SIMON MIETH, DANIEL SCHRAFT, ANDREAS BÜCHEL, PATRIC ACKERMANN UND CHRISTIAN STOCK danken. Wir hatten mit Events wie Klettern, Kletterwald, Paintball, Wandern, Geocaching, Fußballübertragungen, Weihnachtsmarkt, Weihnachtsfeier, Privat-Kinovorstellungen, Hessentag, Tennis, Tischtennis, Volleyball, Lauftreff, TU-Ultramarathon und Fußball auch abseits der Labore und Büros viel Spaß zusammen. Obwohl unsere wissenschaftlichen Themen teils äußerst disjunkt waren, hattet Ihr stets ein offenes Ohr für meine Fragen, gabt Anregungen oder habt Euch zum Korrekturlesen von Manu-



skripten breitschlagen lassen. Da im Laufe meiner Promotion die Arbeitsgruppe enorm wuchs – nicht zuletzt wegen der guten Atmosphäre – kann ich hier nicht alle Absolventen unserer Gruppe aufzählen. Trotzdem möchte ich Euch allen für Euren Beitrag zur guten Atmosphäre danken und Euch alles Gute für Eure Zukunft wünschen.

Dankbar bin ich auch für die gute Infrastruktur sowohl AG-intern durch DAMARIS ZEITLER, NAFISEH SHAHBAZI und THORSTEN PETERS als auch im Institut durch die Feinmechanikwerkstatt (besonders HERRN KALBFLEISCH für Ihre ausgezeichneten Ideen zur Realisierung von Werkstücken), die Elektronikwerkstatt (HERR BAUMANN, HERR KRINGEL und HERR RÖCK), EDV-Experte HERR SCHMUTZLER und FRAU ZILCH für die Posterdrucke.

Ich möchte mich auch bei meinen Freunden bedanken. Dafür, dass Ihr Verständnis hattet, wenn ich aufgrund von Labor- bzw. Büroarbeit wenig Zeit für Euch hatte bzw. dafür, dass ich in der Zeit, die wir zusammen verbrachten von meiner Promotion abschalten konnte. Eine Sonderrolle hat hier ANDREAS RUDOLF inne, mein ehemaliger Studiumskollege, Mitbewohner, Korrekturleser und Freund. Bei unseren all-abendlichen Diskussionen oder morgendlichen „Reste-Ei“ haben wir neben privaten auch alle möglichen fachlichen Fragestellungen besprochen, diskutiert und gelegentlich auch gelöst. Danke für die schöne gemeinsame Zeit.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Familie: Meine Eltern CHRISTIAN und DAGMAR PETZOLD sowie mein Bruder THOMAS PETZOLD. Ihr habt mich stets mit Rat und Tat unterstützt und immer an mich geglaubt. Nicht zu vergessen, meine Freundin XENIA SYDOW, die trotz unserer räumlichen Trennung durch meinen Umzug nach Darmstadt mich stets bei meinen Rückschlägen tröstete und auf andere Gedanken brachte, sowie Erfolge ausgiebig mit mir feierte. Danke mein „shorty“.



# Erklärung zur Dissertation

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation ohne Hilfe Dritter nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben. Alle Stellen, die aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Darmstadt, den 21. Mai 2013

---

(Uwe Petzold)